

UNIVERSIDAD DEL VALLE



**HEREDABILIDAD DE DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS NATURALES Y
ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN EN VARIEDADES DE INTERÉS
COMERCIAL DE *Capsicum***

MAURICIO PEÑUELA ARISTIZÁBAL
Estudiante de Doctorado en Ciencias-Biología

Dr. HEIBER CÁRDENAS HENAO
Director

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
SANTIAGO DE CALI, JULIO DE 2019**

Heredabilidad de descriptores morfológicos naturales y asociados a la producción en variedades de interés comercial de *Capsicum*

Mauricio Peñuela Aristizábal

**Proyecto de Tesis sometido como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias – Biología**

Comité doctoral

Director: Dr. Heiber Cárdenas Henao

Evaluadora interna: Dra. Marisol Gordillo Suárez

Evaluador nacional: Dr. Jaime Eduardo Muñoz Florez

Evaluadora internacional: Dra. Ana Belén Garcés Claver

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
SANTIAGO DE CALI, JULIO DE 2019**

DEDICATORIA

A la memoria de Carlos Alberto Duque Castaño, quién fue mi padre, confidente y amigo, a quien agradezco las enseñanzas brindadas a lo largo de mi vida y los lindos momentos vividos a su lado.

A mi madre Luz Clemencia Aristizábal Aristizábal quien ha sido mi guía y apoyo durante todas las etapas de mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT	12
AGRADECIMIENTOS.....	14
INTRODUCCIÓN GENERAL	15
CAPÍTULO I. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE TRES VARIEDADES COMERCIALES DE <i>Capsicum</i> :UN VISTAZO A LA CORRELACIÓN DE LOS RASGOS Y EL DISTANCIAMIENTO GENÉTICO.....	22
Resumen.....	22
Abstract	23
INTRODUCCIÓN	24
Material vegetal, siembra y mantenimiento de cultivos.....	27
Variables de medición	28
Análisis de datos morfológicos	28
Extracción de ADN	30
Genotipificación con marcadores microsatélites.....	30
Secuenciación, ensamblaje y llamado de marcadores SNP	33
Análisis de datos moleculares	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	49
REFERENCIAS.....	55
CAPÍTULO II. HEREDABILIDAD DE CARACTERES VEGETATIVOS Y ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN EN AJÍ TABASCO (<i>Capsicum frutescens</i> : SOLANACEAE)	60
Resumen.....	60
Abstract	61
INTRODUCCIÓN	63
MATERIALES Y MÉTODOS	67
Material vegetal y área de siembra.....	67
Siembra y mantenimiento del cultivo.....	67

Variables de medición	68
Estimación de la heredabilidad	68
Extracción de ADN y genotipificación	70
Estimación de la diversidad genética	71
RESULTADOS	73
DISCUSIÓN	76
REFERENCIAS.....	85
CAPÍTULO III. HEREDABILIDAD EN <i>Capsicum</i> (SOLANACEAE) USANDO PARENTESCO ESTIMADO CON MARCADORES MOLECULARES	89
Resumen.....	89
Abstract	90
INTRODUCCIÓN	91
MATERIALES Y MÉTODOS	95
Siembra y evaluación fenotípica	95
Extracción de ADN y genotipificación	96
Estimación de la heredabilidad	99
RESULTADOS	101
DISCUSIÓN	104
REFERENCIAS.....	108
DISCUSIÓN GENERAL	115
REFERENCIAS GENERAL.....	123
ANEXOS	124
Anexo 1. Curva de calibración de capsaicina usando metanol como solvente en GCMS.	124
Anexo 2. Condiciones utilizadas por el GCMS en la cuantificación de capsaicina.	125
Anexo 3. Procedimiento para el cálculo del contenido de capsaicina y unidades Scoville.	126
Anexo 4. Curvas de disociación del ADN extraídas a partir de la técnica HRM de 120 individuos pertenecientes a las variedades comerciales de ají Cayena, Tabasco y Habanero. A la izquierda se observan las curvas normalizadas y a la derecha se muestra su diferenciación respecto a la curva más común. a) marcador Ng6 b) marcador Ng7 c) marcador Ng8 d) marcador Ng10.	127

Anexo 5. Curvas de disociación del ADN extraídas a partir de la técnica HRM de 120 individuos pertenecientes a las variedades comerciales de ají Cayena, Tabasco y Habanero. A la izquierda se observan las curvas normalizadas y a la derecha se muestra su diferenciación respecto a la curva más común. a) marcador Ng18 b) marcador Ng20 c) marcador Bd3 d) marcador Bd12.....	128
Anexo 6. Comandos en RStudio para la estimación de la heredabilidad de diferentes rasgos usando parentescos estimados con marcadores microsatélites en <i>C. frutescens</i> , <i>C. chinense</i> y <i>C. annuum</i>	129
Anexo 7. Ejemplo de heredabilidad usando parentescos estimados con marcadores microsatélites del rasgo “Total de frutos” en Tabasco.....	130
Anexo 8. Ejemplo de heredabilidad usando parentescos estimados con marcadores microsatélites del rasgo “Alto del Tallo” para las tres variedades comerciales evaluadas en conjunto.....	133
Anexo 9. Enlaces para la descarga de los datos utilizados en los ejemplos de los Anexos 7 y 8.	136

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Marcadores microsatélites utilizados en este estudio y la secuencia de sus cebadores, los marcadores denominados Ng corresponden a los diseñados por Nagy <i>et al.</i> (2007) y Bd a los diseñados por Lee <i>et al.</i> (2004).....	32
Tabla 1.2. Temperatura de hibridación y número de ciclos usados en la amplificación de los sistemas microsatélites.....	32
Tabla 1.3. Estadísticas descriptivas de los rasgos morfológicos analizados en las variedades de ají Tabasco, Cayena y Habanero.....	36
Tabla 1.4. Contenido de capsaicina y unidades Scoville en un gramo del peso seco del fruto de las variedades comerciales de ají evaluadas.....	38
Tabla 1.5. Frecuencias alélicas de los microsatélites analizados, valores estándares y valores de PIC en las tres variedades de <i>Capsicum</i> estudiadas.....	42
Tabla 1.6. Número de alelos encontrados en cada uno de los <i>loci</i> , junto con los valores de He (Heterocigosidad esperada) y número de perfiles en tres variedades de <i>Capsicum</i> . Los valores de Ho (Heterocigosidad observada) fueron cero para todos los <i>loci</i> en las tres variedades.....	44
Tabla 1.7. Análisis de varianza molecular estimado a partir de ocho marcadores microsatélites en tres variedades de <i>Capsicum</i>	45
Tabla 1.8. Análisis de varianza molecular estimado a partir de 1192 marcadores SNP en tres variedades de <i>Capsicum</i>	46
Tabla 1.9. Índices de diferenciación F_{ST} estimados a partir de ocho marcadores microsatélites (debajo de la diagonal) y 1192 marcadores SNP (sobre la diagonal) en tres variedades de <i>Capsicum</i>	46
Tabla 2.1. Marcadores microsatélites utilizados en este estudio y la secuencia de sus cebadores, los marcadores denominados como Ng corresponden a los diseñados por Nagy <i>et al.</i> (2007) y los Bd a los diseñados por Lee <i>et al.</i> (2004).....	72
Tabla 2.2. Temperatura de hibridación y número de ciclos usados en la amplificación de los sistemas microsatélites.....	72
Tabla 2.3. Parámetros estadísticos estimados para 244 plantas parentales del primer ciclo de cultivo de ají Tabasco.	74

Tabla 2.4. Perfiles genéticos muestreados y tipos de curvas HRM para cada marcador encontradas a través de la amplificación de marcadores moleculares microsatélites para una muestra de 30 plantas de ají Tabasco correspondientes a la generación de parentales.....	74
Tabla 2.5. Heredabilidad en sentido estricto h^2 y valores de repetibilidad espacial R de caracteres vegetativos y asociados a la producción para un cultivo de <i>C. frutescens</i> variedad Tabasco.....	75
Tabla 3.1. Temperatura de hibridación y número de ciclos usados en la amplificación de los sistemas microsatélites.....	98
Tabla 3.2. Frecuencias alélicas para ocho microsatélites en Tabasco, Habanero y Cayena.	102
Tabla 3.3. Heredabilidad para los rasgos Ancho del tallo (An), Alto del Tallo (Al), Días a la floración (Df), Total de frutos (Tf), Peso promedio de frutos (Pf), Ancho promedio de frutos (Af), Largo promedio de frutos (Lf) y Número de semillas (Ns), en las tres variedades comerciales de <i>Capsicum</i>	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferencias en la forma de los frutos entre las variedades comerciales de ají estudiadas.....	26
Figura 1.2. Mediciones quincenales promedio de la altura del tallo y el ancho del tallo de las variedades de ají Tabasco (<i>C. frutescens</i>), Cayena (<i>C. annuum</i>) y Habanero(<i>C. chinense</i>).....	37
Figura 1.3. Análisis de componentes principales de rasgos morfológicos en las tres variedades estudiadas de <i>Capsicum</i>	40
Figura 1.4. Gráficos de Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de Jombart <i>et al.</i> (2010) para datos de marcadores microsatélites y SNP de tres variedades de <i>Capsicum</i>	47
Figura 1.5. Contribuciones de los marcadores microsatélites y SNP en tres variedades de <i>Capsicum</i> a los primeros dos componentes principales usados en el Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de Jombart <i>et al.</i> (2010).....	48
Figura 2.1. Regresiones progenitor-progenie de la altura y ancho del tallo de una línea comercial de ají Tabasco <i>C. frutescens</i> durante 4 meses después de la siembra.....	79
Figura 2.2. Regresiones progenitor-progenie del día a la primera flor y caracteres vegetativos de una línea comercial de ají Tabasco <i>C. frutescens</i>	80
Figura 2.3.Regresiones progenitor-progenie de caracteres asociados a la producción de una línea comercial de ají Tabasco <i>C. frutescens</i>	81
Figura 3.1. Diferencias en la forma de los frutos entre las variedades comerciales de ají estudiadas.....	95
Figura 3.2. Curvas de disociación del ADN obtenidas a partir de la técnica HRM.....	98
Figura 3.3. Distribución de valores de parentesco (r) estimados con el modelo Triadic IBD de Wang (2007) para las variedades comerciales de ají estudiadas.....	101

RESUMEN

El ají se ha convertido en una fuente de ingresos promisorio para el sector agrícola del suroccidente colombiano, debido a la alta productividad alcanzada en la región y su elevada demanda internacional. Conocer el comportamiento fenotípico de un cultivo y la herencia de sus rasgos es objetivo prioritario para programas interesados en explorar selección direccional enfocada al incremento o disminución de un rasgo en particular, lo que podría potencialmente “mejorar” las cualidades del cultivo. En esta investigación se realizó la caracterización morfológica de rasgos vegetativos y productivos de las variedades comerciales de ají Tabasco (*Capsicum frutescens*), Cayena (*Capsicum annuum*) y Habanero (*Capsicum chinense*) para conocer el comportamiento fenotípico de este material vegetal extensamente cultivado en la región. También se desarrolló una caracterización molecular con el objetivo de obtener una descripción genotípica. A partir de los datos fenotípicos obtenidos para la variedad Tabasco, se calculó la heredabilidad de los diferentes rasgos a partir de la metodología regresión progenitor-progenie, la cual requiere un diseño experimental basado en familias, un amplio número de familias y dos generaciones de cultivo. Posteriormente, para conocer si una metodología alternativa podría ofrecer los mismos resultados con menor número de muestra y en una sola generación, se calculó la heredabilidad de los rasgos usando parentescos estimados con marcadores moleculares para las tres variedades comerciales. Los resultados detallan parámetros fenotípicos y genotípicos del material vegetal evaluado y evidencian el poco potencial heredable de los rasgos, posiblemente debido a la reducción de la diversidad genética producto de previos programas de selección. No obstante, se confirma la fuerte incidencia del ambiente en la

respuesta fenotípica de estos cultivos, por lo que se recomienda a los productores la evaluación de los materiales en distintas condiciones y estimación de interacciones genotipo-ambiente para conocer qué condiciones pueden “mejorar” las cualidades de los cultivos. Finalmente, se demostró que la estimación de heredabilidad usando parentesco estimado con marcadores moleculares, ofrece resultados similares a los obtenidos con los métodos clásicos y se propone su uso extendido en diferentes tipos de cultivos para disminuir los tiempos y costos asociados a las estimaciones de heredabilidad en programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: Ají, Marcadores moleculares, Parentesco, Regresión progenitor-progenie.

ABSTRACT

The chili has become a promising source of income for the agricultural sector of southwestern Colombia, due to the high productivities that it presents in the region and its high international demand. To know the phenotypic behavior of a crop and the inheritance of its traits becomes a priority objective for programs that wish to explore directional selection focused on the increase or decrease of a particular trait, which could potentially "improve" the qualities of the crop. In the present research a morphological characterization was made to the vegetative and productive traits of the commercial varieties of chili Tabasco (*Capsicum frutescens*), Cayena (*Capsicum annuum*) and Habanero (*Capsicum chinense*) with the intention of knowing in detail the phenotypic behavior of this plant material extensively cultivated in the region, and a molecular characterization was done with the objective of obtain a genotypic description. From the phenotypic data obtained for the Tabasco variety, the heritability of the different traits was calculated from the progenitor-progeny regression methodology, which requires an experimental design based on families, a large number of families and two generations of cultivation. Later, to know if an alternative methodology could offer the same results with a smaller number of samples and in a single generation, the heritability of the traits was estimated using kinships estimated with molecular markers, in this occasion for the three commercial varieties. The results detail the phenotypic and genotypic parameters of the evaluated plant material and show the low inheritable potential of the traits, possibly due to the reduction of genetic diversity resulting from previous selection programs. However, the strong incidence of the environment in the phenotypic response of these crops is confirmed, so it is recommended to the producers the evaluation of the materials in different conditions, and the estimation

of genotype-environment interactions to know which conditions can "improve" the qualities of crops. Finally, it was demonstrated that the heritability estimation methodology using estimated kinship with molecular markers, offers results similar to those obtained with the classical methodology and its extended use is proposed in different types of crops to reduce the times and costs associated with estimates of heritability in breeding programs.

Key words: Chili, Kinship, Molecular markers, Progenitor-progeny regression.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el macroproyecto: "Implementación del Centro Regional de Investigación e Innovación en Bioinformática y Fotónica, Cali, Valle del Cauca, Occidente" (BPIN 2013000100007). Se brinda un agradecimiento especial al posgrado en Ciencias-Biología y a la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad del Valle por su apoyo durante la ejecución del proyecto, a la Escuela de Ingeniería Agrícola de la Universidad del Valle por permitir la realización de las dos fases de cultivo entre los años 2016-2018 y a la Empresa Hugo Restrepo y Cía. por toda la asesoría brindada en el mantenimiento de los cultivos.

A Hebert Hernández del laboratorio de suelos y aguas de la Universidad del Valle por su apoyo durante la siembra de los cultivos, al ingeniero Edilberto Muñoz y al técnico agrícola Ricardo Pereira de la Empresa Hugo Restrepo y Cía. por su acompañamiento y asistencia durante la realización de este proyecto. Especialmente, se agradece al profesional Alexander Ramírez por el apoyo brindado en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, al ingeniero agrícola Richar Pomeo por la asistencia en el desarrollo del primer ciclo de cultivo.

A los profesores Alejandro Ortíz e Hipolito Isaza del departamento de Química de la Universidad del Valle y al profesional Luis Eduardo Hurtado por toda la colaboración y asistencia brindada en la cuantificación del contenido de capsaicina.

Al doctor José Crossa de la Unidad de Biometría y Estadística de CIMMYT por su acompañamiento durante la realización de mi pasantía en México. A Carolina Sansaloni, Cesar Petroli y Guadalupe Valdez del Servicio de Análisis Genético para la Agricultura SAGA de CIMMYT por su asesoramiento y entrenamiento en las técnicas de secuenciación Illumina.

También un agradecimiento especial a mi profesor Heiber Cárdenas Henao y a su esposa Magda Rodríguez por su constante atención y orientación. A Ronald Viáfara por su apoyo en el área de biología molecular. A Héctor Cifuentes, José Enrique López, Leidy Laura Arias y Juan Sebastián Reina por la colaboración brindada en las extensas jornadas de campo. A Nelson Rivera por su apoyo en los análisis bioinformáticos. Finalmente, a mi madre Luz Clemencia Aristizábal y a mi novia Jenny Gallo por su apoyo incondicional durante todos estos años.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El nacimiento de la agricultura hace miles de años permitió que diferentes tribus alrededor del mundo comenzaran a establecerse en territorios donde las condiciones del terreno fueran aptas y la provisión de agua estuviese siempre disponible, dejando así de lado el estilo de vida predominantemente nómada y dando inicio a los asentamientos humanos que luego fueron cuna de pueblos y civilizaciones. Este proceso fue posible gracias a la domesticación de numerosas plantas, que en un principio evidenciaron atributos de interés, y los cuales con el tiempo, fueron seleccionados recurrentemente por miles de personas a través de la historia, desencadenando la generación de las variedades de plantas que proveen actualmente nuestro alimento.

La selección de los rasgos morfológicos y atributos de diversas plantas, siempre estuvo condicionada a lo que el ser humano consideró como deseado, siendo la selección empírica, el impulso innato que conllevó a la transformación del material vegetal. El descubrimiento de los patrones de herencia por parte de Mendel, tras miles de cruces de guisantes, ofreció el soporte científico para la comprensión de cómo los rasgos eran transmitidos de padres a hijos y ofreció una explicación concisa al parecido entre parientes, lo cual complementó la acción de la selección natural propuesta por Darwin.

Fueron los trabajos de Pearson, Fisher, Haldane y Wrigth, los que a principios del siglo XX formularon los conceptos matemáticos que dieron inicio a la estadística y que estuvieron enfocados a brindar una comprensión objetiva de los fenómenos naturales de evolución en

poblaciones naturales, ayudando a su vez, al entendimiento mecanístico de la selección como herramienta de transformación sobre los organismos. Estos desarrollos sirvieron de base para la estructuración de la *genética cuantitativa*, llevando a avances gigantescos en el incremento de la productividad de los cultivos, que sirvieron para soportar el aumento de la población mundial durante el siglo XX. Todos estos adelantos fueron posibles incluso mucho antes de que se demostrara que el ADN era la molécula encargada de portar la información hereditaria. Descubrimiento que a su vez, conllevó a sus propias innovaciones enfocadas al entendimiento molecular de las variantes y su aprovechamiento directo en múltiples disciplinas incluyendo a la agricultura.

Actualmente, las aplicaciones de las bases teóricas de selección y los distintos desarrollos tecnológicos, han tenido el liderazgo de compañías multinacionales interesadas en el monopolio del mercado de semillas, y algunos centros de investigación y universidades que manifiestan una postura filántropa al direccionar sus avances en generar impacto social, el cual solo en algunas ocasiones se genera a largo plazo. No obstante, la escogencia del cultivo de interés para el desarrollo de la investigación, siempre estará condicionada en suplir las necesidades colectivas y satisfacer las demandas a través de la generación de una oferta apropiada.

Conocer en detalle el comportamiento fenotípico del material vegetal y su herencia, permite a su vez, comprender y predecir las magnitudes esperadas de los rasgos. Para los agricultores y mejoradores de plantas, es de vital importancia estar al tanto de las capacidades fenotípicas de las variedades que cultivan, pues solo así es posible realizar predicciones respecto a la productividad y se puede conocer la viabilidad de un futuro proceso de direccionamiento genético.

La selección, es una fuerza que actúa normalmente en la naturaleza a través de diferentes formas. Su rol más conocido, es el de la selección natural; en este proceso, diferentes fuerzas o condiciones generan presión sobre los organismos, beneficiando a aquellos que presentan las mejores capacidades para enfrentar la adversidad en cuestión. Cuando estos organismos sobreviven al evento, sus descendientes tenderán a incrementarse en la población, mientras que las progenes de los organismos más afectados tenderán a disminuir. Por consiguiente, se espera que la población sufra un cambio y que los rasgos o características que permitieron a un grupo ser más exitoso, sean más frecuentes en la población después del evento de selección.

Muchos de los rasgos presentes en los individuos y que les permiten afrontar eventos de selección, muestran un alto determinismo genético, es decir, estos rasgos están condicionados por las variantes presentes en su información genética y son heredables. Por esta razón, se produce el cambio en las frecuencias de los rasgos en la generación posterior. Sin embargo, no todos los rasgos de un individuo son igualmente heredables. Algunos pueden ser el producto de la presencia de una sola variante o alelo de un gen, otros pueden ser el producto del efecto combinado de varios genes, y otros simplemente pueden ser el resultado de la interacción de cientos o miles de variantes genéticas, que combinadas con determinadas condiciones ambientales, producen el rasgo fenotípico que observamos y cuantificamos. Asimismo, existen rasgos fenotípicos que son enteramente producto de las condiciones ambientales donde los individuos se encuentran y desarrollan, por lo que estos rasgos no serán heredables al no ser producto de la información genética de los individuos.

En los individuos que criamos y cultivamos, los seres humanos podemos ejercer selección sobre algunos rasgos, logrando de esta manera un cambio en su frecuencia y ajustándolos a

nuestras necesidades o deseo, permitiendo que los individuos que los posean sean los padres de la siguiente generación. Este tipo de selección es conocida como selección artificial y por lo general se realiza en una sola dirección, es decir, puede utilizarse para incrementar o disminuir un rasgo. Por ejemplo, en la selección de las plantas que dieron origen al maíz actual, se seleccionaron plantas con mayor cantidad de granos, originando que las variedades actuales sean muy diferentes de sus antepasados silvestres en lo correspondiente al tamaño del fruto. A su vez, se seleccionaron individuos que florecían más tempranamente, disminuyendo así la cantidad de días promedio en que los cultivos estaban aptos para cosecha.

No obstante, para que estos procesos de selección direccional muestren resultados efectivos, es necesario que los rasgos presenten una fuerte influencia genética y que exista variabilidad entre los individuos que seleccionamos. Esta variabilidad entre los individuos se convierte en la materia prima de todo proceso de selección, puesto que si existe una gran variabilidad, al seleccionar un grupo reducido de individuos, el cambio en las frecuencias del rasgo de interés será más prominente, en comparación a si realizamos la selección de un mismo número de individuos en un grupo con poca variabilidad. La magnitud de la respuesta a la selección, dependerá en gran medida de que tan heredable sea el rasgo, es decir, en qué proporción ese rasgo en las progenies depende de la información genética recibida por la población parental. Siendo la heredabilidad, un parámetro poblacional clave para determinar si un proceso de selección cumplirá los objetivos propuestos.

La heredabilidad, puede considerarse como un parámetro poblacional, puesto que depende de las frecuencias alélicas de los genes que configuran el rasgo, siendo estas frecuencias alélicas por lo general diferentes de un conjunto de individuos a otro. Así, un rasgo en

particular puede tener una heredabilidad alta en una población y una heredabilidad media o baja en otra. La heredabilidad, generalmente denotada por h^2 , es en sí una proporción entre varianzas, y muestra en qué proporción el rasgo evaluado es determinado por un componente hereditario, usualmente llamado varianza aditiva o V_A , respecto a la varianza total del rasgo V_P en el conjunto de individuos (Falconer & Mackay 1996). Asimismo, para conocer la varianza aditiva, deben desarrollarse experimentos donde se conozca el parentesco entre individuos, puesto que se cuantifica estadísticamente la varianza explicada por el parentesco.

Conocer los valores de heredabilidad para cada rasgo en particular que deseemos seleccionar es de vital importancia, porque si un rasgo es poco heredable, se puede perder gran cantidad de tiempo, esfuerzo y dinero, en tratar de generar un avance que no se producirá. Razón por la cual, la determinación de la heredabilidad debe ser un objetivo prioritario en estudios que pretendan realizar una posterior selección direccional de los rasgos, y más aun cuando se pretende generar beneficios económicos.

En ají, se han realizado diversos estudios en lo referente a la descripción morfológica de los rasgos, diversidad genética y estimación de la hereabilidad. Sin embargo, como se mencionó previamente, estos parámetros deben ser evaluados independientemente en cada población de interés, para lograr así un entendimiento conciso del material vegetal de estudio y permitir su empleo eficaz en términos biológicos y comerciales. Por esta razón, esta investigación doctoral enfocó sus esfuerzos en la determinación de estos parámetros en las variedades comerciales de ají Tabasco, Cayena y Habanero, cultivadas en el Valle del Cauca, por la empresa Hugo Restrepo y Cía.

La presente tesis doctoral es resultado de la apuesta de tres sectores en Colombia, el gobierno nacional, las empresas del sector agrícola y las instituciones de educación superior. Los cuales impulsan investigaciones enfocadas a suplir necesidades de la cadena productiva del país, para generar avances en contextos económicos con la aplicación del conocimiento adquirido y avances en ámbitos sociales mediante la formación académica de profesionales en el territorio orientados al desarrollo regional. Las preguntas de investigación planteadas en este documento, pretenden acercarse a la comprensión de diferentes procesos que envuelven la caracterización morfológica de los rasgos y su determinismo genético.

Esta investigación alrededor de los cultivos de ají, fue desarrollada en tres secciones que se complementan mutuamente y comprenden los capítulos de este documento. En el primer capítulo se describen en detalle a través distintos parámetros estadísticos y moleculares, las variedades comerciales de ají Tabasco, ají Cayena y ají Habanero, ampliamente cultivadas en la región con fines productivos. Precisamente, en este capítulo se discute la correlación entre rasgos de las variedades y se evidencia distanciamiento genético entre ellas. En el segundo capítulo se aborda, de manera más concisa, el estudio de la heredabilidad de los rasgos, usando como modelo la variedad Tabasco y desarrollando experimentos en los que el objetivo es comparar los datos obtenidos por padres e hijos para brindar una cuantificación confiable del potencial del cultivo a un proceso de selección. Finalmente, en el tercer capítulo se implementa una metodología novedosa para la estimación de la heredabilidad de los rasgos, que incluye la utilización de marcadores moleculares para extraer el parentesco entre individuos, permitiendo así conocer los valores de heredabilidad

utilizando un menor número de individuos para su estimación y en un menor tiempo, lo que conlleva a la reducción de los costos y conocer de manera más rápida si son factibles futuros planes de mejoramiento.

El objetivo general de este estudio fue conocer la variabilidad fenotípica y genotípica de las variedades de ají cultivadas en la región y establecer cuan heredables son sus rasgos. Todo bajo la hipótesis de que dentro de cada variedad el determinismo genético de sus rasgos es amplio y puede ser empleado como fuente para el direccionamiento genético deseado. Durante el proceso de investigación se aplicaron numerosas metodologías experimentales y de análisis de datos, que permitieron dilucidar el estado particular de los parámetros evaluados, los cuales pueden ser desarrollados y escalados a otros tipos de cultivos.

CAPÍTULO I. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE TRES VARIEDADES COMERCIALES DE *Capsicum*: UN VISTAZO A LA CORRELACIÓN DE LOS RASGOS Y EL DISTANCIAMIENTO GENÉTICO

Resumen

Capsicum es un género de hortalizas con una gran demanda global debido a la presencia de pungencia en sus frutos. Las especies *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense* son las más cultivadas y se encuentran cercanamente emparentadas, conformando grupo conocido como complejo *annuum*. Dentro de estas especies existen variedades con una gran diversidad morfológica ampliamente explotada comercialmente. En la presente investigación se realizaron mediciones morfológicas a variedades comerciales de ajís; Tabasco, Cayena y Habanero, ampliamente cultivadas en la región del suroccidente colombiano con el objetivo de generar una descripción fenotípica detallada y conocer la correlación entre rasgos. Además se implementaron marcadores moleculares microsatélites y SNP para evaluar el distanciamiento genético entre ellas. Se estimaron parámetros estadísticos descriptivos para los rasgos evaluados en cada variedad comercial y se encontraron correlaciones morfológicas positivas entre el número de semillas, peso del fruto y largo del fruto, e independencia o baja correlación de este grupo de rasgos frente al diámetro del fruto, día a la primera flor, número de frutos y productividad. Además, se estimó el contenido de capsaicina de los frutos y se evaluó la probabilidad de formar híbridos entre estas variedades. La caracterización molecular empleando marcadores microsatélites y SNP, evidenció ausencia de individuos heterocigotos y un amplio distanciamiento genético entre las variedades comerciales evaluadas, lo que soportó la imposibilidad de formar híbridos. Esta información resulta de gran utilidad para cultivadores y mejoradores que deseen utilizar y evaluar estos materiales vegetales.

Palabras clave: ADN, Análisis multivariados, Ají, Microsatélites, SNP.

Abstract

Capsicum is a gender of vegetables which presents a great global demand due to the presence of pungency in its fruits. The species *C. annuum*, *C. frutescens* and *C. chinense* are the most cultivated and are closely related, forming a group known as the *annuum* complex. Inside these species exist varieties that present a big morphological diversity and that have been widely exploited commercially. In the present research morphological measurements were done to the commercial varieties of chili Tabasco, Cayena and Habanero, extensively cultivated in the region of southwestern Colombia to make a detailed phenotypic description and to know the correlation between traits. Furthermore, microsatellite and SNP molecular markers were implemented to evaluate the genetic distancing among varieties. As result, descriptive statistic parameters were estimated for evaluated traits in each commercial variety and positive correlations were found among the traits seeds number, weight of fruit and length of fruit, and independence or low correlation among this group of traits versus to fruit diameter, day to first flower, number of fruits and productivity. Furthermore, the capsaicin content of the fruits was estimated and the probability of forming hybrids between these varieties was evaluated. The molecular description using microsatellite and SNP markers evidenced absence of heterozygous individuals and a wide genetic distance between the commercial varieties evaluated, which supported the impossibility to form hybrids. This information is very useful for growers and breeders who wish to use and evaluate these plant materials.

Keywords: Chili pepper, DNA, Microsatellites, Multivariate analysis, SNP.

INTRODUCCIÓN

Los ajís pertenecen al género *Capsicum* son originarios de América del Sur y Central (Pickersgill 1969, Mínguez-Mosquera & Hornero-Mendes 1994). Se reconocen aproximadamente 35 especies en este género (Carrizo-García *et al.* 2013). Basándose en evidencias arqueológicas de hace por lo menos 7000 años en Centroamérica, se considera a *Capsicum* entre los primeros géneros domesticados (Basu & Krishna 2003). Desde su domesticación en épocas precolombinas, los ajís han sido llevados alrededor del mundo siendo introducidos a Europa, África y Asia (González-Pérez *et al.* 2014). Las especies más importantes económicamente se ubican en el complejo *annuum* (*C. annum*, *C. chinense* y *C. frutescens*) y son ampliamente cultivadas alrededor del mundo (Pickersgill 1997, Kumar *et al.* 2006). Evidencias filogenéticas han demostrado la monofilia del complejo *annuum* respecto a las demás especies del género, sin embargo, las diferencias interespecíficas dentro del clado no se han resuelto todavía (Carrizo-García *et al.* 2016). Además, las formas domesticadas de las especies que pertenecen al complejo muestran variaciones de tamaño, forma, posición, color y pungencia en sus frutos, reflejando una convergencia en rasgos morfológicos como resultado de la selección humana (Pickersgill 1979, Jarret & Dang 2004).

Las especies de *Capsicum* son arbustos con flores mayormente estrelladas y con diversos patrones de pigmentación, producen bayas carnosas, principalmente globosas, de diferentes formas y colores (Carrizo-García *et al.* 2016). Todas las especies del género *Capsicum* son conocidas porque producen compuestos capsaicinoides, responsables de la pungencia (Savitha & Salimath 1995, Perkins *et al.* 2002, Stewart *et al.* 2007, Barbero *et al.* 2008). La capsaicina es un compuesto natural encontrado en los frutos en distintas

proporcionessiendo sintetizado en la placenta de los frutos e incluso en el pericarpo de algunos ajís super picantes (Iwai *et al.* 1979, Stewart *et al.* 2007, Bosland *et al.* 2015). Se han reportado muchos estudios sobre los rasgos de los frutos, sin embargo, no se comprenden bien las relaciones entre estos rasgos (Ben-Chaim & Paran 2000). Conocer el comportamiento fenotípico de los rasgos que hacen a un cultivo valioso comercialmente, es de vital importancia para los productores que deseen “mejorar” sus variedades o conocer su respuesta en diferentes condiciones. También se hace relevante frente a programas de conservación de la diversidad y seguridad alimentaria (Chavez-Servia *et al.* 2004). Por esta razón, numerosos estudios cualitativos y cuantitativos han realizado la caracterización morfológica de múltiples accesiones de *Capsicum* (Castañón-Nájera *et al.* 2008, Pérez-Castañeda 2008, Pardey 2008, Castañón-Nájera *et al.* 2010).

Debido a que la diversidad morfológica usualmente se encuentra relacionada con la diversidad genética, también se han realizado múltiples inventarios de la diversidad genética de accesiones de *Capsicum* con la implementación de marcadores moleculares microsatélites (Lee *et al.* 2004, Oyacama *et al.* 2006, Nagy *et al.* 2007, Pardey-Rodríguez *et al.* 2009, Yumnan *et al.* 2012, Marcos-Pérez 2013, González-Pérez *et al.* 2014, Villegas *et al.* 2014, Rivera *et al.* 2016). Estos marcadores han sido ampliamente usados debido a su codominancia, estabilidad, capacidad de detección de múltiples alelos, su fácil aplicación y su excelente sensibilidad particularmente entre especies (Varshney *et al.* 2005). No obstante, otros marcadores moleculares como los SNP también han sido de gran utilidad para conocer la diversidad genética y la estructura poblacional de grandes colecciones de germoplasma en *Capsicum* (Kang *et al.* 2014, Lee *et al.* 2016, Taranto *et al.* 2016), puesto que se caracterizan por ser abundantes en el genoma, son en su mayoría bialélicos y en años

recientes, han comenzado a reemplazar a los microsatélites en estudios de genética de poblaciones, como también en un vasto rango de aplicaciones (Tsykun *et al.* 2017).

Actualmente, en el suroccidente colombiano se cultivan ampliamente las variedades comerciales de Tabasco perteneciente a la especie *C. frutescens*, Cayena perteneciente a la especie *C. annuum*, y Habanero perteneciente a la especie *C. chinense*, las cuales han llegado a convertirse en cultivos promisorios para la agricultura regional. Aunque estas especies hacen parte del complejo *annuum*, sus variedades pueden presentar grandes diferencias en características morfológicas y organolépticas que las distinguen fácilmente y permiten dilucidar el amplio espectro de los rasgos dentro del complejo (Figura 1.1). Por otra parte, el distanciamiento genético entre estas especies ha sido poco estudiado a nivel autosómico, debido a que los estudios más importantes se han realizado a nivel filogenético partiendo del análisis de las secuencias de algunos genes (Walsh & Hoot 2001, Carrizo-García *et al.* 2016). En esta investigación se realizó una caracterización morfológica y molecular de las variedades comerciales de Tabasco, Cayena y Habanero con el objetivo de obtener una descripción detallada de sus rasgos morfológicos, su diversidad genética y la posibilidad de generar híbridos entre ellas. Esta comparación morfológica y molecular puede ofrecer pistas sobre la correlación fenotípica de los rasgos y brindar una cuantificación del distanciamiento genético entre las variedades.



Figura 1.1. Diferencias en la forma de los frutos entre las variedades comerciales de ají estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal, siembra y mantenimiento de cultivos

Se escogieron las variedades de ajís; Tabasco (*C. frutescens*), Cayena (*C. annuum*), y Habanero (*C. chinense*), debido a que presentan amplias diferencias morfológicas entre ellas y a su vez hacen parte de especies pertenecientes al complejo *annuum*. Se realizó una siembra experimental de 40 plantas por cada una de las variedades evaluadas, a las cuales se le realizaron mediciones fenotípicas y extracción de ADN. La siembra del material vegetal se desarrolló en el área contigua al Laboratorio de Aguas y Suelos de la Escuela de Ingeniería Agrícola de la Universidad del Valle en Cali-Colombia, coordenadas geográficas 3° 22' 22.23'' N y 76° 31' 47.82'' O. Se elaboraron surcos de 0.6 m de ancho, con distancias de siembra entre plantas del mismo surco de 0.35 m y entre plantas de surcos contiguos de 1.5 m. La siembra de plántulas se realizó a los 40 días después de su germinación en invernadero. Se implementó un sistema de riego por goteo con aperturas en las cintas de riego cada 10 cm. El riego se realizó diariamente durante todas las etapas del cultivo, salvo en temporadas de lluvia. El mantenimiento agronómico consistió de aplicaciones foliares mensuales preventivas de una mezcla de acaricida, insecticida, fungicida y bactericida, y solo cuando fue estrictamente necesario aplicaciones semanales de un agroinsumo en específico. Se realizó fertilización edáfica de nutrientes mayores y menores (relación 5 a 1) a cada planta mensualmente, con 5 g de la mezcla de fertilizantes a 5 cm de la raíz. Permanentemente, se erradicaron de forma manual las plantas herbáceas que aparecían entre surcos y a dos metros alrededor de los cultivos.

Variables de medición

Durante la etapa de crecimiento se midieron quincenalmente la altura de la planta y grosor del tallo en la base en (cm) y se inventarió el número de días a la primera flor después de la siembra. Se realizó el conteo del número de frutos por cada planta y se escogieron cinco frutos al azar por planta para mediciones de largo (cm), diámetro (cm), peso promedio (g) y número de semillas. Finalmente, la productividad por planta fue estimada a partir del producto entre el número de frutos y peso promedio del fruto por cada planta.

Análisis de datos morfológicos

La descripción morfológica se realizó a través de parámetros como la media, la mediana, desviaciones estándar, valores mínimos, valores máximos y coeficientes de variación para cada uno de los rasgos estudiados. Se utilizaron modelos de regresión lineal para describir el crecimiento vegetativo de las variedades y se evaluó el grado de ajuste de cada modelo a los datos. Se realizaron análisis de componentes principales para conocer el grado de correlación fenotípica de los rasgos entre variedades, también para conocer el aporte de cada rasgo a la diferenciación y aproximarse gráficamente a una descripción multivariada de los datos.

Polinización cruzada

Se realizaron diez réplicas de los seis tipos de cruces posibles entre las tres variedades comerciales evaluadas, en los cuales cada variedad fue donadora y receptora de polen. Para el desarrollo de la polinización cruzada se abrieron los botones florales maduros de las plantas receptoras y se cortaron sus estambres. Posteriormente se polinizó el estigma con

polen extraído de plantas donadoras. Las flores fueron marcadas y monitoreadas en días posteriores para evaluar su fructificación.

Cuantificación de capsaicina

Se recolectaron frutos maduros de las tres variedades comerciales evaluadas y se secaron a 60 °C entre 3 y 4 días. Los frutos secos fueron molidos en mortero con ayuda de nitrógeno líquido y el material procesado fue almacenado. Se realizaron tres muestras por cada variedad, para las cuales se pesó 0.1 g de material procesado en balanza analítica, el cual fue introducido en un tubo ependorf de 2 mL, en el que luego se añadió 1 mL de metanol grado HPLC. Las muestras fueron calentadas en baño maría a 50 °C durante 5 horas realizando agitación por vortex cada hora. Posteriormente fueron centrifugadas a 6000 rpm durante cinco minutos. El volumen del sobrenadante fue cuantificado usando micropipetas y trasladado a viales GC para su análisis. Se prepararon soluciones estándares de capsaicina de 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 mg/L, en metanol grado HPLC para la elaboración de la curva (Anexo 1).

La cuantificación de capsaicina se realizó por cromatografía de gases acoplada a masas (GCMS) con la ayuda de un equipo autoinyector AOC-20i (Shimadzu, Japan). Se utilizó una columna Rtx-5MS (fase estacionaria constituida por 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano), 30 m x 0.25 mm i. d. (Restek, USA). En principio se siguió el protocolo de Nwokem *et al.* (2010) y posteriormente se realizaron modificaciones para mejorar la detección (Anexo 2). El procedimiento para el cálculo del contenido de capsaicina y unidades Scoville se muestra en el (Anexo 3).

Extracción de ADN

Se utilizaron 0.3 g de tejido foliar fresco y se siguió el protocolo de extracción de ADN utilizado por Doyle & Doyle (1987) con las modificaciones de Stewart (1993). Se trituró el tejido foliar en un mortero y se añadió 500 µL de solución de homogenización (PVP 2%, NaCl 1.42M, Tris HCL 100 mM ajustado a pH 8, EDTA 0.5M pH 8.0 y CTAB 2%), luego se transfirió la solución a un tubo de 2.0 mL y se agregó 3µL de β-mercaptoetanol, posteriormente se sometió a baño maría por 50 min a 65 °C, mezclando por inversión cada 10 min. Finalizada la incubación se añadieron 500 µL de solución de extracción compuesta de cloroformo: alcohol isoamílico en una relación 24:1 y se mezcló usando vortex. Luego se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min y posteriormente se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, se adicionaron 800 µL de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión 10 veces para homogenizar. Se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó por inversión en una toalla de papel a temperatura ambiente por tres horas. El botón ubicado en el fondo del tubo fue disuelto en 500 µL de LowTE y almacenado a -20 °C.

Genotipificación con marcadores microsatélites

Se amplificaron dos marcadores microsatélites reportados por Lee *et al.* (2004) y seis por Nagy *et al.* (2007) para 40 plantas por cada variedad (Tabla 1.1). El programa de amplificación estuvo compuesto por una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, hibridación (Tabla 1.2) por 30s y extensión a 72°C por 1min; finalizando con una extensión final a 72°C por 5 min. Las condiciones anteriores fueron estandarizadas en el termociclador Biorad T100TM.

Posteriormente, se realizaron reacciones de curvas de disociación de alta resolución (HRM), utilizando el equipo Biorad CFX96 Real Time System, para la discriminación de alelos usando 5 µL de reactivo de Precision Melt Supermix, 0.7 µM de cada cebador (forward y reverse), 35 ng de ADN y 0.1 µL de agua destilada y desionizada para un volumen total de 10 µL. El análisis de HRM se inició con una desnaturalización a 95 °C por 5 min y luego disminuyó la temperatura a 60°C por 30 s y finalmente, se aumentó la temperatura progresivamente en 0.2 °C por cada ciclo de 10 s para realizar el registro de la fluorescencia hasta llegar a 95 °C. La discriminación de los perfiles de disociación por alelos se hizo a través del software Precision Melt Analysis™ v1.2. La técnica HRM utiliza fluoróforos que se intercalan al ADN de doble cadena y cuantifica mediante Q-PCR la disociación de las cadenas dobles a cadenas simples a medida que se incrementa la temperatura. Permite la visualización de variantes debido a que separa las moléculas de ADN basándose en su longitud y composición, consiguiendo distinguir cambios hasta de un nucleótido. En *Capsicum* esta técnica ha sido empleada exitosamente para visualizar SNP que permiten la distinción entre especies (Jeon *et al.* 2010) y la detección de accesiones pungentes y no pungentes (Rodríguez-Maza *et al.* 2012). Específicamente para la visualización de marcadores microsatélites se ha implementado HRM en cultivares de *Prunus avium*, *Lens culinaris* y *Olea europea* (Ganopoulos *et al.* 2011, Bosmali *et al.* 2012, Xanthopoulou *et al.* 2014).

Los distintos perfiles de curvas obtenidos por la técnica HRM fueron registrados y cada perfil diferente se identificó como un alelo, posteriormente se compilaron todos los perfiles obtenidos en las tres variedades evaluadas. Se construyó una matriz alélica para cada uno de los marcadores y se calcularon los parámetros de diversidad entre las variedades, como:

número de alelos presentes, heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), perfiles genéticos (haplotipos) y el contenido de información polimórfica (PIC).

Tabla 1.1. Marcadores microsatélites utilizados en este estudio y la secuencia de sus cebadores, los marcadores denominados como Ng corresponden a los diseñados por Nagy *et al.* (2007) y los Bd a los diseñados por Lee *et al.* (2004).

SSR	Locus	Cebador (5'-3')	
		Forward	Reverse
Ng6	CA515649	tctccaatttcattcggag	taatcgatttgcaacttg
Ng7	CA525390	ggaaactaaacacactttctctc	actggacgccagtttgattc
Ng8	CA516044	atcttcttctcatttctccctc	tgctcagcattaacgacgtc
Ng10	CA516334	accaccttcatcaacaacc	atttggtggttttcgaaacg
Ng18	CA517699	acgccaagaaaatcatctcc	ccattgctgaagaaaatggg
Ng20	BM061461	ctcattaccacttcatacaaaacag	tgtagtaggtgtgtgtacgg
Bd3	Hpms1-173	tgctgggaaagatctcaaaagg	atcaaggaagcaaaccaatgc
Bd12	Hpms1-139	ccaacagtaggacccgaaaatcc	atgaaggctactgtgctgatcc

Tabla 1.2. Temperatura de hibridación y número de ciclos usados en la amplificación de los sistemas microsatélites.

SSR	Temperatura de hibridación (°C)	Ciclos	Temperatura de hibridación (°C)	Ciclos
Ng6	55	40		
Ng7	55	40		
Ng8	60	40		
Ng10	60	40		
Ng18	65 ^a	5	60	30
Ng 20	60	40		
Bd3	58.1	40		
Bd12	65 ^a	5	60	30

^a ciclos en cascada para disminuir la amplificación de productos no específicos a -1°C en cada ciclo.

Secuenciación, ensamblaje y llamado de marcadores SNP

El ADN total de dos muestras escogidas al azar por cada variedad sembrada, fue preparado siguiendo la metodología Dart-seq propuesta en Sansaloni *et al.* (2011). Para las seis muestras escogidas, se realizaron dos digestiones enzimáticas; una con Pst/NspI y otra con Pst/HpaII. El ADN digerido fue analizado en el secuenciador Illumina Hi-seq 2500 por el Servicio de Análisis Genético para la Agricultura (SAGA) en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en Batán, México. Posteriormente, los análisis bioinformáticos fueron desarrollados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle.

Se obtuvieron lecturas con una longitud de 77 pb. La calidad de las lecturas de los archivos .fastq fue examinada en el programa FASTQC v0.11.8. Se recortaron los primeros 8 a 9 nucleótidos correspondientes a los códigos de barras de identificación de las muestras y se concatenaron los archivos correspondientes a las dos digestiones por muestra. Luego se empleó el programa BWA usando el comando `index` para generar un archivo con extensión .fnadel genoma de referencia PRJNA376668 de *Capsicum annuum* (Hulse-Kemp *et al.* 2018). A continuación se usó el comando `mem` de BWA para generar archivos alineados al genoma de referencia y renombrarlos con la extensión .sam. En el programa SAMtools se utilizó el comando `view` para llamar los archivos .sam y el comando `sort` para organizar las lecturas alineadas de cada archivo y renombrarlos con la extensión .bam. Estos archivos .bam de cada una de las muestras fueron ejecutados en el programa STACKS utilizando el comando `ref_map.pl` y posteriormente el comando `populations` para obtener el listado de SNP alineados al genoma de referencia en formato vcf. El archivo .vcf generado fue filtrado para extraer sitios con una profundidad

igual o superior a 4X usando el programa GATK. Finalmente, a partir del archivo filtrado, se extrajo el número de SNP en estado de heterocigosis para cada muestra usando el comando `--het` del programa VCFtools.

Análisis de datos moleculares

Tanto para los marcadores microsatélites, como para los marcadores SNP, se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequin 3.5.2.2 con los niveles de variación: entre variedades, entre individuos dentro de variedades y dentro de individuos. También se estimaron los índices de diferenciación F_{ST} entre variedades. Los datos de microsatélites y SNP fueron transformados a formato genind para la realización del Análisis Discriminantes de Componentes Principales (DAPC) de Jombart *et al.* (2010) en el paquete `adegenet` de R (Jombart & Ahmed 2011). El archivo `.vcf` de los marcadores SNP fue transformado a formato genind a través de la librería `vcfR`, usando los comandos `read.vcfR` y `vcfR2genind`.

RESULTADOS

La comparación morfológica de las variedades Tabasco (*C. frutescens*), Cayena (*C. annum*), y Habanero (*C. chinense*) se muestran en la (Tabla 1.3). Las diferencias morfológicas entre las variedades fueron amplias en relación a los rasgos asociados con el fruto. Tabasco presentó un gran número de frutos, de tamaño pequeño y de poco peso, mientras que las variedades Cayena y Habanero registraron menor cantidad de frutos con mayor peso y tamaño. La variedad Cayena se caracterizó por poseer frutos muy largos y carnosos, y la variedad Habanero por tener frutos globosos. A pesar de estas grandes diferencias morfológicas, las variedades de Tabasco y Cayena presentaron valores similares de productividad en función de gramos por planta. Las variables de altura y ancho del tallo pueden ser descritas en función de un modelo de regresión lineal con un alto grado de ajuste para las tres variedades, en donde se evidencia una mayor tasa de crecimiento en Tabasco, seguido por Cayena y Habanero ($R^2 > 0.90$) (Figura 1.2). Respecto al rasgo día a la primera flor, la variedad Cayena se caracterizó por iniciar su floración más tempranamente, mientras que Tabasco y Habanero presentaron valores similares.

El análisis de componentes principales para las tres variedades en conjunto, evidenció un alto grado de correlación entre los rasgos número de semillas, peso del fruto y largo del fruto, e independencia o baja correlación de este grupo de rasgos respecto al diámetro del fruto, día a la primera flor, número de frutos y productividad. El gráfico de los dos primeros componentes principales explicó el 87.9% de la variabilidad de los datos, además, se evidenciaron agrupaciones consistentes de los individuos por variedad y cercanos a los vectores de las variables donde sus valores son mayores (Figura 1.3).

Tabla 1.3. Estadísticas descriptivas de los rasgos morfológicos analizados en las variedades de ají Tabasco, Cayena y Habanero.

Rasgo	Media	Mediana	Máximo	Mínimo	D.E.	C.V.
Variedad Tabasco <i>C. frutescens</i>						
Día a la primera flor	55.59	55.00	65.00	48.00	4.88	8.78
Número de frutos	535.45	560.50	1252.00	2.00	297.36	55.53
Largo del fruto (cm)	3.10	3.13	3.52	2.39	0.22	7.27
Diámetro del fruto(cm)	0.87	0.87	0.97	0.71	0.05	6.65
Peso del fruto (g)	0.98	1.01	1.26	0.57	0.14	14.90
Número de Semillas por fruto	32.92	33.60	41.40	16.20	5.14	0.15
Productividad (g)	559.62	545.69	1426.15	1.15	306.29	54.73
Variedad Cayena <i>C. annum</i>						
Día a la primera flor	45.89	44.00	64.00	36.00	5.16	11.24
Número de frutos	11.31	11.00	21.00	3.00	4.79	42.39
Largo del fruto (cm)	22.76	22.46	27.65	17.66	2.69	11.86
Diámetro del fruto(cm)	2.94	2.98	3.65	1.96	0.38	13.04
Peso del fruto (g)	44.08	45.00	57.45	19.05	10.00	2.69
Número de Semillas por fruto	146.00	148.00	193.00	47.00	29.17	19.86
Productividad (g)	523.90	477.18	1194.9	103.50	276.23	52.72
Variedad Habanero <i>C. chinense</i>						
Día a la primera flor	62.80	61.00	89.00	45.00	11.39	18.14
Número de frutos	6.10	3.50	33.00	1.00	7.66	125.62
Largo del fruto (cm)	3.69	3.66	5.19	2.65	0.60	16.40
Diámetro del fruto(cm)	2.59	2.53	3.30	2.05	0.35	14.02
Peso del fruto (g)	8.25	7.42	16.65	3.97	3.29	39.94
Número de Semillas por fruto	51.11	45.50	103.00	24.00	21.00	41.08
Productividad (g)	59.15	22.37	549.45	5.20	118.195	201.08

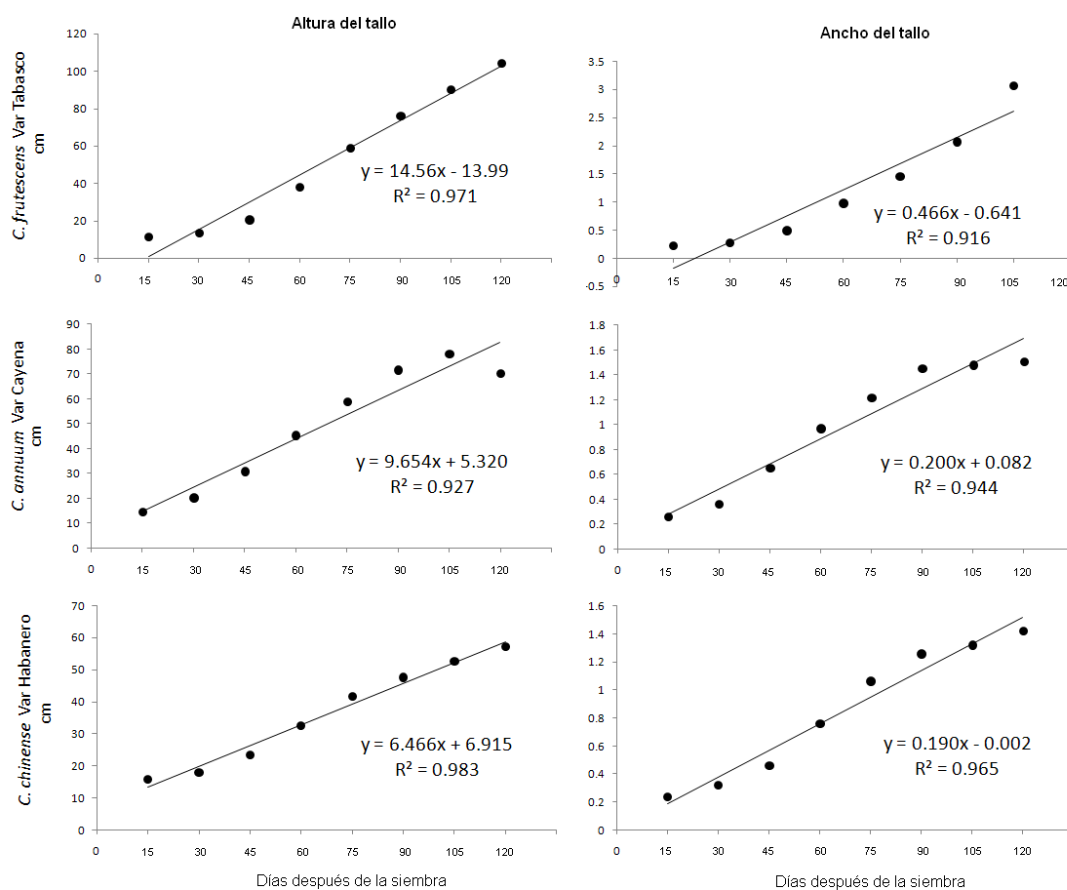


Figura 1.2. Mediciones quincenales promedio de la altura del tallo y el ancho del tallo de las variedades de ají Tabasco (*C. frutescens*), Cayena (*C. annuum*) y Habanero(*C. chinense*).

No se produjo fructificación en las flores a las que se les desarrolló polinización cruzada, indicando que no se producen híbridos entre las variedades comerciales evaluadas. El contenido de capsaicina en mg respecto a un gramo de peso seco del fruto y unidades Scoville fueron mayores para Habanero, con valores muy cercanos a los de Tabasco. El contenido de capsaicina y unidades Scoville para Cayena fue diferente a las demás variedades presentando valores muy bajos (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Contenido de capsaicina y unidades Scoville en un gramo del peso seco del fruto de las variedades comerciales de ají evaluadas.

Variedad	Contenido de Capsaicina mg/g $\pm$ E.E.	Unidades Scoville $\pm$ E.E.
Tabasco	43.35 $\pm$ 3.76	693606.80 $\pm$ 60243.61
Cayena	3.12 $\pm$ 0.15	49920.88 $\pm$ 2371.58
Habanero	54.37 $\pm$ 5.83	869873.04 $\pm$ 93292.65

Se registraron los distintos perfiles de curvas obtenidos por la técnica HRM (Anexos 4 y 5). Las frecuencias alélicas de los microsatélites analizados, valores de PIC, número de alelos encontrados en cada uno de los *loci* se muestran en la Tabla 1.5. Se encontraron en promedio para las tres variedades 4.12 alelos por *locus* y en todos los casos uno de los alelos se encontró fijo o en alta frecuencia respecto a los demás. En siete de los ocho *loci* se encontraron alelos privados para cada variedad. Los valores PIC evaluados en conjunto para las tres variedades fueron más altos para los sistemas Ng7, Ng18 y Bd3, los cuales

presentaron mayor número de alelos privados, indicando que estos *loci* discriminan con mayor potencia el material evaluado. La heterocigosidad esperada y número de perfiles para las tres variedades de *Capsicum* estudiadas se muestran en la Tabla 1.6. No se registraron individuos heterocigotos para los sistemas evaluados en ninguna de las variedades, por lo que el valor de la heterocigosidad observada para todos los casos es cero. Con respecto a los análisis de secuenciación Illumina, para las seis muestras evaluadas, dos por cada variedad, se obtuvieron lecturas con valores de calidad óptimos (Phred Score superior a 30). Los archivos obtenidos se encuentran disponibles en el Genbank con el número de acceso *Bioproject* PRJNA547834. Después de procesar los archivos, se extrajeron un total de 5216 SNP alineados al genoma de referencia PRJNA376668, de los cuales 1192 presentaron una profundidad igual o superior a 4X. El promedio de la heterocigosidad observada encontrada por variedad fue de 0.0488 ± 0.0006 para Tabasco, 0.0586 ± 0.0053 para Habanero y 0.0401 ± 0.0051 para Cayena.

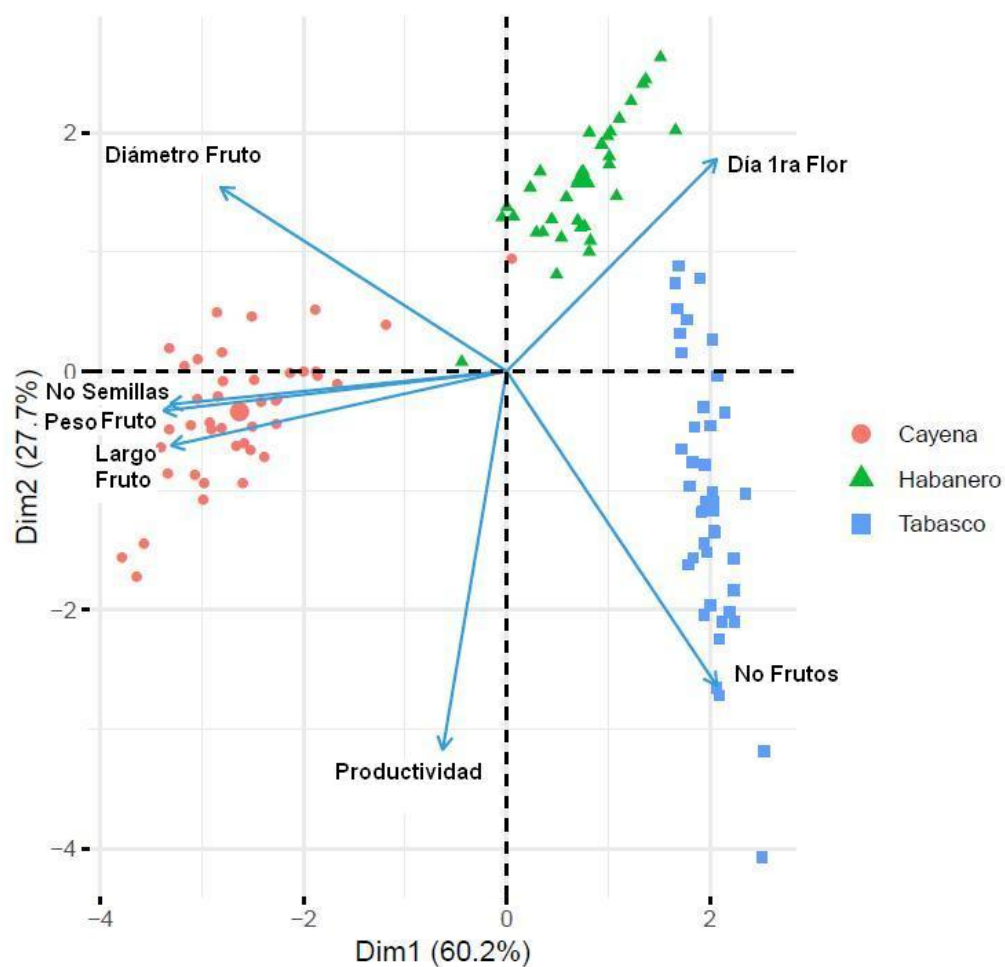


Figura 1.3. Análisis de componentes principales de rasgos morfológicos en las tres variedades estudiadas de *Capsicum*.

Los análisis de varianza molecular realizados para los marcadores microsatélites y SNP fueron mutuamente consistentes indicando que el mayor porcentaje de variación se encuentra entre el componente variedades (Tablas 1.7 y 1.8). En ambos se evidencia que la mayor fuente de variación se encuentra en el componente “Entre variedades” y se diferencian básicamente en que para la AMOVA realizada con microsatélites, el componente “Dentro de individuos” no presentó variación debido a la ausencia de heterocigotos para estos sistemas, mientras que para la AMOVA realizada con SNP esta

variación fue del 7.4%. Los valores de F_{ST} extraídos a partir del AMOVA para ambos tipos de marcadores indican que existe un alto grado de diferenciación genética entre variedades (Tabla 1.9).

Los análisis de DAPC mostraron una clara diferenciación entre las variedades evaluadas, siendo los resultados consistentes entre ocho microsatélites evaluados en 40 individuos por variedad y 1192 SNP en dos individuos por variedad (Figura 1.4). En ambos casos la retención de los dos primeros componentes principales fue suficiente para explicar la variabilidad de los datos; para microsatélites los dos primeros componentes explicaron el 70.1% de la variabilidad, mientras que para SNP explicaron el 98.7 %. El 100% de la variabilidad fue retenida en 30 componentes principales para los datos de microsatélites y 5 componentes principales para los datos de SNP, generando grupos donde no fue posible diferenciar los individuos debido al aumento de la variabilidad entre grupos y la disminución de la variabilidad dentro de ellos (Figura 1.4b y 1.4d). En los marcadores microsatélites los *loci* Ng10, Ng18 y Bd 3 contribuyeron en gran proporción al primer componente y los *loci* Ng8 y Ng10 al segundo componente, mientras que los marcadores SNP lo hicieron todos en muy baja proporción (Figura 1.5).

Tabla 1.5. Frecuencias alélicas de los microsatélites analizados, valores estándares y valores de PIC en las tres variedades de *Capsicum* estudiadas. En negrilla alelos privados.

		Tabasco	Cayena	Habanero	PIC
<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>C. frutescens</i>	<i>C. annuum</i>	<i>C. chinense</i>	
Ng6	1	0.257	0.000	1.000	0.665
	2	0.000	0.927	0.000	
	3	0.743	0.000	0.000	
	4	0.000	0.049	0.000	
	5	0.000	0.024	0.000	
PIC		0.314	0.133	0.000	
Ng7	1	0.868	0.000	0.000	0.705
	2	0.000	0.795	0.000	
	3	0.132	0.000	0.969	
	4	0.000	0.205	0.000	
	5	0.000	0.000	0.031	
PIC		0.203	0.273	0.058	
Ng8	1	1.000	0.000	0.972	0.447
	2	0.000	1.000	0.000	
	3	0.000	0.000	0.028	
PIC		0.000	0.000	0.053	
Ng10	1	1.000	1.000	0.000	0.4960
	2	0.000	0.000	0.676	
	3	0.000	0.000	0.235	
	4	0.000	0.000	0.059	
	5	0.000	0.000	0.029	
PIC		0.000	0.000	0.429	

Continuación Tabla 1.5. Frecuencias alélicas de los microsatélites analizados, valores estándares y valores de PIC en las tres variedades de *Capsicum* estudiadas. En negrilla alelos privados.

Ng18	1	0.974	0.000	0.000	0.727
	2	0.000	0.000	0.971	
	3	0.000	0.659	0.000	
	4	0.000	0.341	0.000	
	5	0.026	0.000	0.000	
	6	0.000	0.000	0.029	
PIC		0.049	0.348	0.055	
Ng20	1	1.000	0.976	0.972	0.034
	2	0.000	0.024	0.000	
	3	0.000	0.000	0.028	
PIC		0.000	0.046	0.053	
Bd3	1	0.000	0.976	0.000	0.707
	2	0.974	0.000	0.000	
	3	0.000	0.000	0.829	
	4	0.000	0.000	0.171	
	5	0.000	0.024	0.000	
	6	0.026	0.000	0.000	
PIC		0.049	0.046	0.243	
Bd12	1	0.658	0.000	0.676	0.546
	2	0.211	1.000	0.265	
	3	0.132	0.000	0.059	
PIC		0.450	0.000	0.401	

Tabla 1.6. Número de alelos encontrados en cada uno de los *loci*, junto con los valores de He (heterocigosidad esperada) y número de perfiles en tres variedades de *Capsicum*. Los valores de Ho (Heterocigosidad observada) fueron cero para todos los *loci* en las tres variedades.

Variedad	Locus	Número de alelos	He	Número de perfiles
Tabasco <i>C. frutescens</i>	Ng6	2	0.382±0.073	11
	Ng7	2	0.229±0.063	
	Ng8	1	0.000±0.000	
	Ng10	1	0.000±0.000	
	Ng18	2	0.051±0.027	
	Ng20	1	0.000±0.000	
	Bd3	2	0.051±0.027	
Cayena <i>C. annuum</i>	Bd12	3	0.506±0.387	10
	Ng6	3	0.138±0.051	
	Ng7	2	0.326±0.070	
	Ng8	1	0.000±0.000	
	Ng10	1	0.000±0.000	
	Ng18	2	0.450±0.061	
	Ng20	2	0.048±0.164	
	Bd3	2	0.048±0.026	
	Bd12	1	0.000±0.00	

Continuación Tabla 1.6. Número de alelos encontrados en cada uno de los *loci*, junto con los valores de H_e (heterocigosidad esperada) y número de perfiles en tres variedades de *Capsicum*. Los valores de H_o (Heterocigosidad observada) fueron cero para todos los *loci* en las tres variedades.

Variedad	Locus	Número de alelos	H_e	Número de perfiles
Habanero <i>C. chinense</i>	Ng6	1	0.000±0.000	20
	Ng7	2	0.061±0.035	
	Ng8	2	0.054±0.176	
	Ng10	4	0.483±0.074	
	Ng18	2	0.056±0.028	
	Ng20	2	0.054±0.176	
	Bd3	2	0.284±0.055	
	Bd12	3	0.469±0.387	

Tabla 1.7. Análisis de varianza molecular estimado a partir de ocho marcadores microsatélites en tres variedades de *Capsicum*.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación (%)
Entre variedades	2	296.022	1.920	79.72
Entre individuos dentro de variedades	112	109.421	0.488	20.28
Dentro de individuos	115	0.000	0.000	0.00
Total	229	405.443	2.409	

Tabla 1.8. Análisis de varianza molecular estimado a partir de 1192 marcadores SNP en tres variedades de *Capsicum*.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación (%)
Entre variedades	2	2859.00	354.27	94.61
Entre individuos dentro de variedades	3	37.25	-7.75	-2.07
Dentro de individuos	6	167.50	27.91	7.46
Total	11	3063.75	374.43	

Tabla 1.9. Índices de diferenciación F_{ST} estimados a partir de ocho marcadores microsatélites (debajo de la diagonal) y 1192 marcadores SNP (sobre la diagonal) en tres variedades de *Capsicum*.

	Tabasco	Cayena	Habanero
Tabasco	-	0.943	0.933
Cayena	0.827	-	0.939
Habanero	0.727	0.826	-

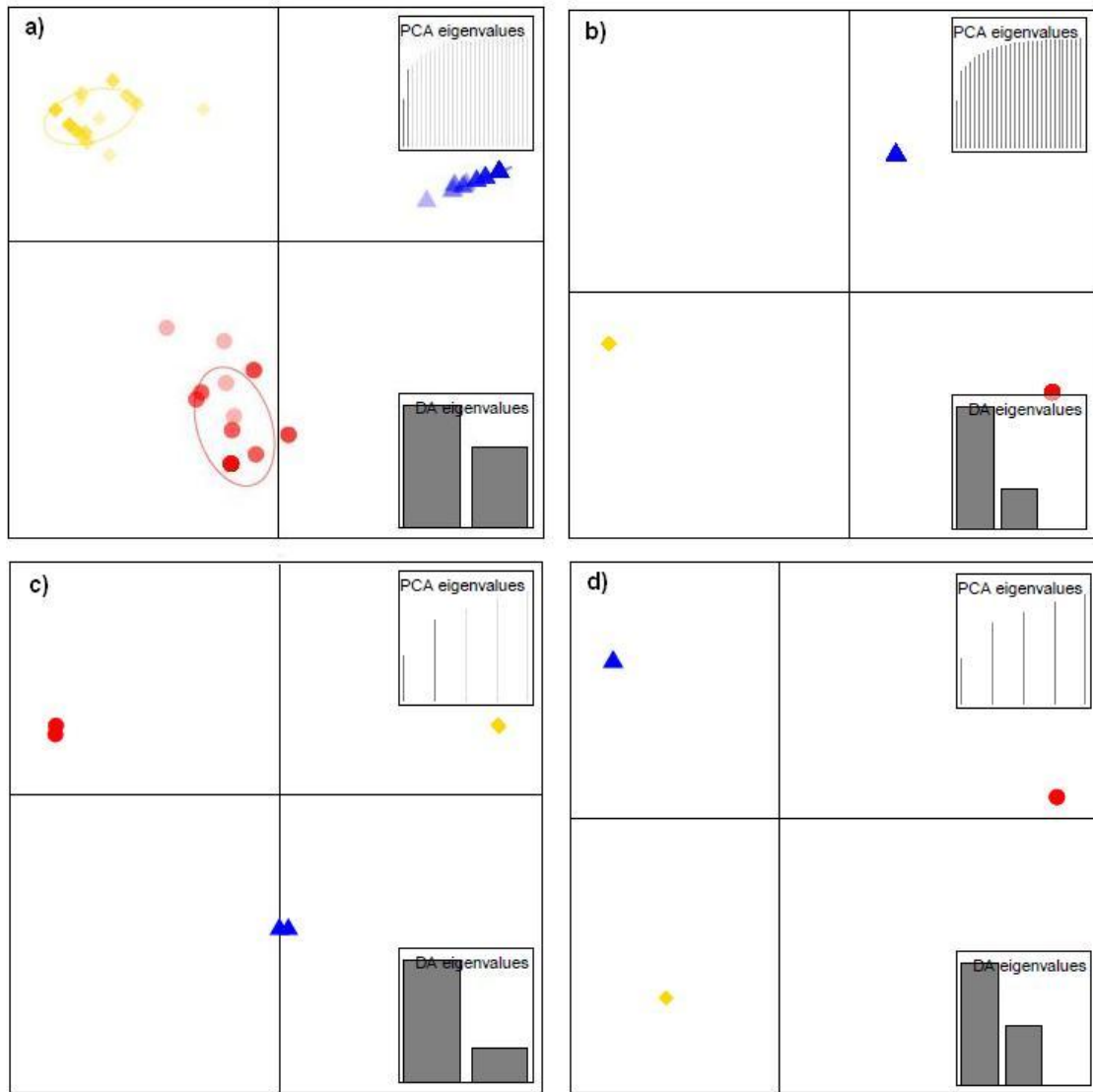


Figura 1.4. Gráficos de Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de Jombart *et al.* (2010) para datos de marcadores microsatélites y SNP de tres variedades de *Capsicum*; variedad Tabasco (círculos rojos), variedad Cayena (triángulos azules), variedad Habanero (rombos amarillos), símbolos más oscuros indican que varios individuos tienen la misma coordenada. a) microsatélites con dos componentes principales retenidos. b) microsatélites con 30 componentes principales retenidos. c) SNP con dos componentes principales retenidos. d) SNP con 5 componentes principales retenidos.

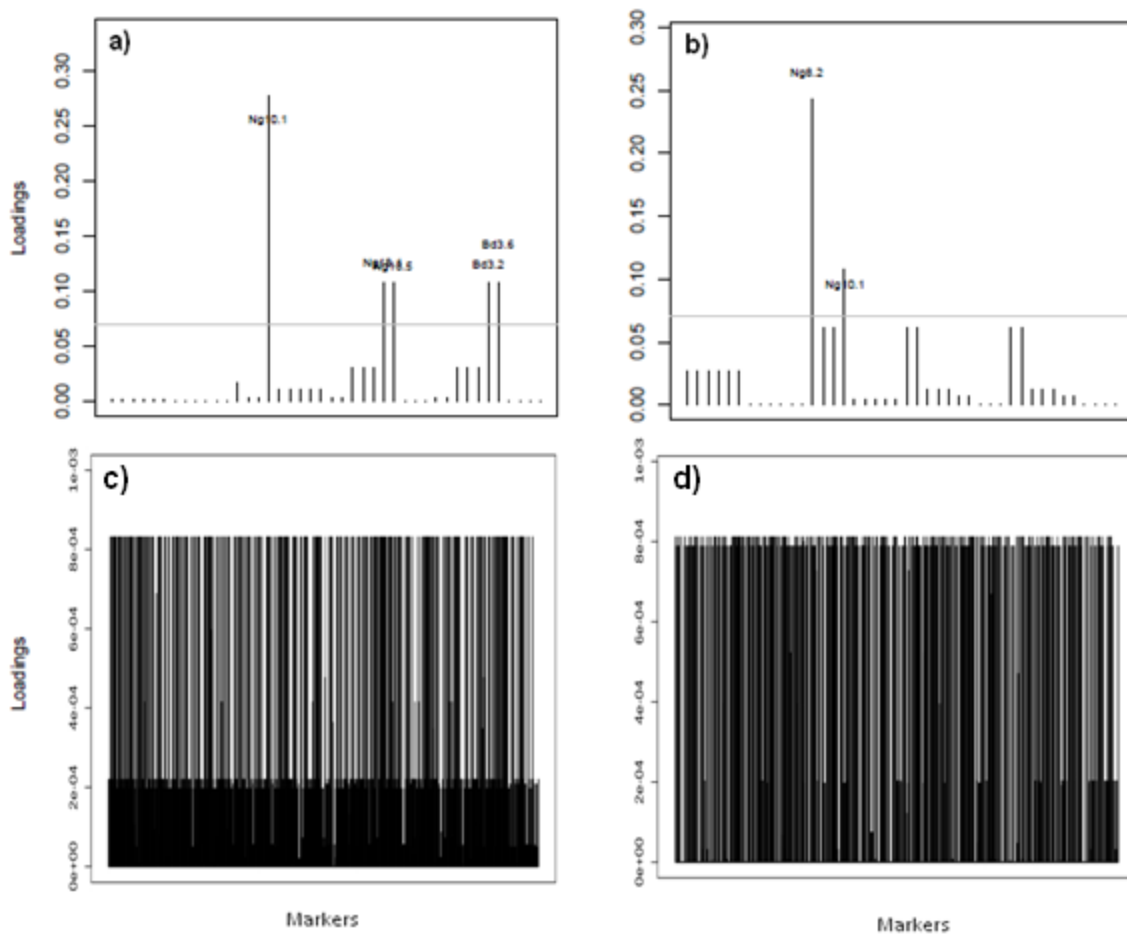


Figura 1.5. Contribuciones de los marcadores microsatélites y SNP en tres variedades de *Capsicum* a los primeros dos componentes principales usados en el Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de Jombart *et al.* (2010). a) primer componente con microsatélites. b) segundo componente con microsatélites. c) primer componente con SNP. d) segundo componente con SNP.

DISCUSIÓN

En todas las variedades la tasa de crecimiento fue levemente menor en los primeros días. Este tipo de crecimiento con una tendencia al ajuste logístico ha sido reportado previamente para diversas especies de plantas herbáceas (Sun & Frelich 2011), sin embargo, el elevado grado de ajuste de los datos al modelo lineal y su mayor simplicidad priorizan su elección en este estudio. La variedad Tabasco, alcanzó las mayores alturas de tallo y obtuvo una mayor pendiente, indicando que su crecimiento vegetativo es más acelerado, caso contrario a lo que ocurrió con la variedad Habanero. Es probable que esta mayor inversión en crecimiento esté relacionada con la necesidad energética de producir un gran número de frutos. Relaciones similares entre el costo de la reproducción y el crecimiento han sido demostradas previamente para la orquídea *Tipularia discolor* por Snow & Whigman (1989).

El análisis de componentes principales, permitió conocer el grado de correlación entre variables morfológicas para las tres variedades evaluadas. Esta aproximación multivariada conservó el 87.9% de la variabilidad de los datos y evidenció que los rasgos largo del fruto, peso del fruto y número de semillas se encuentran altamente correlacionados dentro del complejo de especies, y por tanto es factible que hayan respondido de manera concertada ante procesos de selección. El género *Capsicum* resulta ser un buen modelo de estudio para abordar este tipo de cuestiones pues es un grupo monofilético (Walsh & Hoot 2001, Olmstead *et al.* 2008, Carrizo-García *et al.* 2016), relativamente joven con aproximadamente 13 Millones de años (Särkinen *et al.* 2013) y que se caracteriza por

poseer una gran diversidad morfológica en lo correspondiente a sus frutos (Ben-Chaim & Paran 2000).

Aunque las diferencias morfológicas sean evidentes entre un grupo de especies cercanamente relacionadas, puede ser de gran utilidad para los mejoradores inferir como son las correlaciones morfológicas entre sus rasgos. Es probable que el incremento del largo del fruto esté relacionado con el incremento del tamaño de la placenta, lo cual justificaría el aumento del número de semillas dentro de los frutos, evidente en la variedad Cayena. Correlaciones similares han sido encontradas por Ben-Cham & Paran (2000) entre el diámetro del pedicelo, diámetro del fruto y ancho del pericarpo en *C. annuum*, para las cuales los autores sugieren la acción de genes comunes en estos rasgos.

Por el contrario, el rasgo número de frutos se encuentra correlacionado negativamente con el diámetro del fruto, lo que podría evidenciar que el incremento del número de frutos dentro del complejo, ha ido en contra del diámetro de los mismos, algo que resultaría razonable debido a los requerimientos energéticos de producir una gran cantidad de frutos. Igualmente se observó que para las variedades comerciales evaluadas, el demorarse más días para florecer afecta negativamente el rasgo productividad. Esta amplia diversidad morfológica, es producto tanto de la historia evolutiva de las especies del género como de la selección artificial llevada a cabo por los seres humanos, por lo que es de gran utilidad para los mejoradores y agricultores comprender las correlaciones morfológicas entre los rasgos si se desea aproximarse a la respuesta fenotípica de estos en futuros programas de selección.

Aunque las especies *C. frutescens*, *C. annuum*, y *C. chinense* pertenecen al complejo *annuum* y se han reportado hibridación entre ellas dado a que se encuentran filogenéticamente emparentadas (Walsh & Hoot 2001, Carrizo-García *et al.* 2016), los cruces realizados entre las variedades Tabasco, Cayena y Habanero, no presentaron formación de frutos después de la polinización, dando como resultado la caída de la flor receptora. Es muy probable que la diferenciación morfológica y genética entre estas variedades comerciales evaluadas sea tan amplia, que sean inviables los híbridos entre ellas. Tal como lo evidencian los comentarios de los agricultores de la región del Valle del Cauca, quienes afirman que tras varias décadas de cultivo simultáneo de las variedades, nunca han observado híbridos entre ellas.

La variedad Habanero presentó el contenido de capsaicina más alto de las tres variedades evaluadas (54.37 mg/g en promedio), seguida por Tabasco que presentó un contenido de capsaicina cercano de 43.35 mg/g en promedio y Cayena con un promedio de contenido de capsaicina bastante bajo con respecto a las demás con 3.12 mg/g. Aunque los valores de contenido de capsaicina por gramo de fruto seco sean similares entre las variedades de Habanero y Tabasco, debe recordarse que un fruto de Habanero es más pungente que uno de Tabasco, pues contiene alrededor de 9 g mientras que un fruto de Tabasco es de alrededor de 1g. Resultados que concuerdan con la pungencia percibida organolépticamente.

La divergencia entre las especies resulta ser mejor cuantificada a través de marcadores moleculares (Awise 1994), debido a que muchos de ellos no presentan sensibilidad a la selección, permitiendo así conocer y cuantificar de forma neutral la diferenciación entre especies. Para las variedades estudiadas, los ocho microsatélites evaluados fueron

amplificados exitosamente en todos los individuos usando la técnica HRM. Encontrándose en la mayoría de los *loci* y para las tres variedades comerciales evaluadas, un alelo muy frecuente acompañado de otros poco frecuentes, y en muchos casos la fijación de un alelo en particular (Tabla 1.5). La similitud genética en los individuos evaluados dentro de cada variedad puede ser reflejo de procesos de selección, frecuentes en variedades extensamente cultivadas (Hammer *et al.* 2003, Lee *et al.* 2016). La ausencia de individuos heterocigotos en todos los sistemas concuerda con los altos niveles de autogamia del género en accesiones silvestres y cultivadas (González-Pérez *et al.* 2014) y se convierten en un factor que magnifica el efecto de homogenización observado dentro de las variedades.

Un comportamiento similar se observó en los datos de secuenciación Illumina, donde se reportaron un total de 1192 SNP con una profundidad igual o superior a 4X, para los cuales la heterocigosidad observada promedio fue de alrededor de 0.046, indicando la baja proporción de individuos heterocigotos y soportando los resultados obtenidos a través de microsatélites. Estos resultados de baja heterocigosidad observada en *Capsicum* son similares a los reportados por Lee *et al.* (2016) con 48 SNP en 3821 accesiones y por Taranto *et al.* (2016) con 32950 SNP en 222 accesiones. Estos bajos grados de heterocigosidad observada son explicados por la alta frecuencia de autopolinización, permitida por la autocompatibilidad de polen presente en las especies del complejo *annuum* (Onus & Pickersgill 2004).

El elevado porcentaje de variación en el componente “Entre variedades” es esperado en el AMOVA, puesto que se evaluaron variedades con grandes diferencias morfológicas, siendo a su vez entidades pertenecientes a especies diferentes. Los altos valores de F_{ST} para ambos tipos de marcadores evidencian que el proceso de divergencia genética es elevado, al igual

que lo revelan valores similares de F_{ST} en otras accesiones de *Capsicum* (Taranto *et al.* 2016) y otras especies de solanáceas como *Solanum quitoense* y *Solanum betaceum* (Enciso-Rodríguez *et al.* 2010).

El análisis de DAPC mostró una evidente separación entre las tres variedades estudiadas tanto para marcadores microsatélites como para SNP, demostrando que la estructuración de los datos es muy fuerte (Figura 1.4). Esta aproximación multidimensional de los datos que parte de estrategias de análisis diferentes a los análisis tradicionales, se encuentra acorde con los resultados de AMOVA y F_{ST} , puesto que evidencia poca variabilidad dentro de grupos y una amplia diferenciación entre ellos.

La retención de solo dos componentes principales tanto en los análisis con microsatélites como de SNP fue suficiente para exponer la estructuración de los datos en el DAPC (Figura 1.5). Mientras los microsatélites requirieron de 30 componentes principales para explicar el total de la variabilidad de los datos, los SNP solo requirieron de cinco. Esto puede explicarse debido a la naturaleza de cada tipo de datos. En los microsatélites el aporte de algunos *loci* a la diferenciación es muy grande en los primeros componentes y ayudan a estructurar los conjuntos de datos, sin embargo, el resto de las frecuencias alélicas descritas continúan aportando a la diferenciación en los componentes restantes. Caso contrario a lo que ocurre en los SNP pues son muchos los marcadores que contribuyen en la estructuración de los primeros componentes principales pero lo hacen todos en muy baja proporción.

Como se ha comprobado en este estudio tanto los microsatélites como los SNP son marcadores moleculares con resultados similares en análisis de estructura genética, este

mismo tipo de comparaciones se han llevado a cabo para un amplio rango de estudios en diferentes organismos (Defaveri *et al.* 2013). Sin embargo, no se debe pasar por alto que existen grandes diferencias metodológicas entre ambos; los marcadores microsatélites pueden presentar un mayor número de alelos por *loci*, pero puede ser extremadamente laboriosa su evaluación en un grupo considerable de individuos para que el análisis poblacional sea robusto. Por el contrario, los marcadores SNP son bialélicos, pero tienen la ventaja de que suelen ser marcadores muy abundantes en plantas (Taranto *et al.* 2016) y pueden recoger una amplia variabilidad del genoma, permitiendo que pueda reducirse considerablemente el número de individuos para realizar los análisis y presentar resultados poblacionales robustos (Willing *et al.* 2012).

En conclusión, las amplias diferencias morfológicas entre las tres variedades evaluadas y las correlaciones entre rasgos, pueden ser de gran utilidad para comprender como procesos de selección natural y artificial han afectado al género. Estos resultados encontrados para el género *Capsicum* pueden incluso ser transversales y presentar comportamientos similares en otros géneros de plantas. Por otra parte, el distanciamiento genético cuantificado a través de marcadores microsatélites y SNP y valorado a través de diversas metodologías de análisis, demuestran que las variedades comerciales que fueron evaluadas en este estudio, presentan un alto grado de diferenciación genética a nivel autosómico, información que complementa y acredita los resultados de diversos estudios filogenéticos realizados con otras metodologías para el conjunto de especies.

REFERENCIAS

- Awise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- Barbero, G. F. Liazid, A. Palma, M. Barroso, C.G. 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* 75:1332-1337.
- Basu Ks, Krishna, A. 2003. *Capsicum*. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles. London: Taylor & Francis. 11 New Fetter Lane, London EC4P4EE. 277 pp.
- Ben-Chaim, A. Paran, I. 2000. Genetic analysis of quantitative traits in pepper (*Capsicum annuum*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125(1): 66-70.
- Bosmali, I. Ganopoulos, I. Madesis, P. Tsaftaris, A. 2012. Microsatellite and DNA-barcode regions typing combined with High Resolution Melting (HRM) analysis for food forensic uses: A case study on lentils (*Lens culinaris*). *Food Research International* 46: 141-147.
- Carrizo-García, C. Sterpetti, M. Volpi, P. Ummarino, M. Saccardo, F. 2013. Wild capsicums: identification and in situ analysis of Brazilian species. In: Lanteri S, Rotino GL, eds. Breakthroughs in the genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant. Turin: Eucarpia, 205–213.
- Carrizo-García, Barfuss, M. H. J. Sehr, E. M. Barbosa, G. E. Samuel, R. Moscone, E. A. Ehrendorfer, F. 2016. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany* 118: 35-51.
- Castañón-Nájera, G. Latourneire-Moreno, L. Lesher-Gordillo, J.M. Cruz-Lázaro, E. & M. Mendoza-Elos. 2010. Identificación de variables para caracterizar morfológicamente colectas de Chile (*Capsicum* spp.) En Tabasco, México. *Universidad y Ciencia Trópico* Número 26(3): 225-234.
- Castañón-Nájera, G. Latourneire-Moreno, L. Mendoza-Elos, M. Vargas-López, A. & H. Cárdenas-Morales. 2008. Colección y caracterización de Chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 77: 189-202.
- Chávez-Servia, J. L. Tuxill, J. Jarvis, D. I. (eds). 2004. Manejo integrado de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali. Colombia.
- Defaveri, J. Viitaniemi, H. Leder, E. Merillä, J. 2013. Characterizing genic and nongenic molecular markers: comparison of microsatellites and SNPs. *Molecular Ecology Resources* 13: 377-392.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Ganopoulos, I. Argiriou, A. Tsaftaris, A. 2011. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* 22: 532-541.

González-Pérez, S. Garcés-Claver, A. Mallor, C. Sáenz de Miera, L. E. Fayos, O. Pomar, F. Merino, F. Silvar, C. 2014. New insights into *Capsicum* spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. *PLoS ONE* 9(12): e116276.

Hamer, K. Arrowsmith, N. Gladis, T. 2003. Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften* 90: 241-250.

Hulse-Kemp, A. Maheshwari, S. Stoffel, K. Hill, T. A. Jaffe, D. Williams, S.R. Weisenfeld, N. Ramakrishnan, S. Kumar, V. Shah, P. Schatz, M. C. Church, D. M. Deynze, A. V. 2018. Reference quality assembly of the 3.5-Gb genome of *Capsicum annuum* from a single linked-read library. *Horticulture Research* 5:4.

Iwai, K. Suzuki, T. Fujiwaka H. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var *annuum* cv. Karayatsubusa at different stages of flowering. *Agric Biol Chem* 43: 2496-2498.

Jarret, R. L. Dang, P. 2004. Revisiting the waxy locus and the *Capsicum annuum* L. complex. *Georgia Journal of Science* 62 (2): 118-132.

Jeong, H-J. Jo, Y.D. Park, S-W. Kang, B-C. 2010. Identification of *Capsicum* species using SNP markers based on high resolution melting analysis. *Genome* 53: 1029-1040.

Jombart, T. Ahmed, I. 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 3070-3071.

Jombart, T. Devillard, S. Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11:94.

Kang, J. H. Yang, H. B. Jeong, H. S. Cheo, P. Kwon, J. K. Kang, B. C. 2014. Single nucleotide polymorphism marker discovery from transcriptome sequencing for marker-assisted backcrossing in *Capsicum*. *Kor J. Hortic. Sci. Technol.* 32: 535-543.

Kumar, S. Kumar, R. Singh, J. 2006. Cayenne/American pepper (*Capsicum* species). In: Peter KV, (ed). *Handbook of herbs and spices*. Woodhead, Cambridge, pp 299-312.

Lee, H-Y. Ro, N-Y. Jeong, H-J. Kwon, J-K. Jo, J. Ha, Y. Jung, A. Han, J. Venkatesh, J. Kang, B-C. 2016. Genetic diversity and population structure analysis to construct a core collection from a large *Capsicum* germoplasm. *BMC Genetics* (17): 142.

Lee J. M., Nahm S.H., Kim Y.M., and Kim B.D., 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite *loci* in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 619-627.

Marcos-Pérez, D. 2013. Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia. Tesis de maestría. Universidad de Coruña. 46 pp.

Mínguez-Mosquera, M. J. Hornero-Mendes, D. 1994. Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agridulce J. *Agric. Food Chem.* 42: 38-44.

Nagy I., Stágel A., Sasvári Z., Röder M., Ganai M. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 50: 668–688.

Nwokem, C. O. Agbaji, E. B. Kagbu, J. A. Ekanem, E. J. 2010. Determination of Capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. *New York Science Journal* 3(9): 17-21.

Olmstead, R. G. Bohs, L. Migid, H. A. Santiago-Valentin, E. Garcia, V. F. Collier, S. M. 2008. A molecular phylogeny of Solanaceae. *Taxon* 57: 1159-1181.

Onus, A. N. Pickersgill, B. 2004. Unilateral incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and taxonomic distribution 94: 289-295.

Oyama, K., Hernández-Verdugo, S., Sánchez, C., González-Rodríguez, A., Sánchez-Pena, P., Garzón-Tiznado, J. A. & Casas, A. 2006. Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53(3): 553-562.

Pardey, C. 2008. Caracterización y evaluación de Accesiones de *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional sede Palmira y determinación del modo de herencia a Potyvirus. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional.

Pardey Rodríguez, C., García Dávila, M. A. & Vallejo Cabrera, F. A. 2009. Evaluación agronómica de accesiones de *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. *Acta Agronómica* 58(1): 23-28.

Pérez-Castañeda, L.M. Castañón-Nájera, G. & N. Mayek-Pérez. 2008. Diversidad morfológica de chiles (*Capsicum* spp.) de Tabasco, México. *Cuadernos de Biodiversidad* 27:11-22.

Perkins, B. Bushway, R. Guthrie, K. Fan, T. Stewart, B. Prince, A. Williams, M. 2002. Determination of capsaicinoids in salsa by liquid chromatography and enzyme immunoassay. *J. AOAC Int.* 85 (1): 82-85.

Pickersgill, B. 1969. The archeological record of chilli peppers (*Capsicum* spp) and the sequeunce of plant domestication in Peru. *American Antiquity* 34:53-61.

Pickersgill, B. Heiser, C. B. Jr. McNeill, J. 1979. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In the *Biology and Taxonomy of the Solanaceae* (Hawkers, Lester and Skelding, Eds.) NY: Academic Press 679-700.

Rivera, A., Monteagudo, A. B., Igartua, E., Taboada, A., García-Ulloa, A., Pomar, F., Riveiro-Leira, M. & Silvar, C. 2016. Assessing genetic and phenotypic diversity in pepper (*Capsicum annuum* L.) landraces from North-West Spain. *Scientia horticultrae*, 203: 1-11.

Rodríguez-Maza, M.J. Garcés-Claver, A. Park, S-W. Kang, B-C. Arnedo-Andrés, M. S. 2012. A versatile PCR marker for pungency in *Capsicum* spp. *Mol. Breeding* 30: 889-898.

Särkinen, T. Bohs, L. Olmstead, R. G. Knapp, S. 2013. A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evoluatinary Biology* 13: 214.

Savitha, G. Slimath, B. P. 1995. Effects of capsaicin on phospholipase A2 activity and superoxide generation in macrophages, *Nutr. Res.* 15: 1417-1427

Snow, A. A. Whigham, D. F. 1989. Cost of flower and fruit production in *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *Ecology* 70(5): 1286-1293.

Stewart, C. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14(5):748-750.

Sun, S. Frelich, L. E. 2011. Flowering phenology and height growth pattern are associated with maximun plant height, relative growth rate and stem tissue mass density in herbaceous grassland species. *Journal of Ecology* 99: 991-1000.

Taranto, F. D'Agostino, N. Greco, B. Cardi, T. Tripodi, P. 2016. Genome-wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing. *BMC Genomics* 17:943.

Tsykun, T. Rellstab, C. Dutech, C. Sipos, G. Prospero, S. 2017. Comparative assessment of SSR and SNP marckers for inferring the population genetic structure of the common fugun *Armillaria cepistipes*. *Heredity* 119: 371-380.

Varshney, R. K. Graner, A. Sorrells, M.E. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.* 10:621-630.

Villela, J. C. B., Barbieri, R. L., Castro, C. M., Neitzke, R. S., De Vasvoncelos, C. S., Carbonari, T., Mistura, C. C. & Priori, D. 2014. Caracterização molecular de

variedades crioulas de pimentas (*Capsicumbaccatum*) com marcadores microsatélites. Horticultura Brasileira 32(2).

Walsh, B. M. Hoot, S. B. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. International Journal of Plant Sciences 162: 1409-1418.

Willing, E-M. Dreyer, C. Oosterhout, C. V. 2012. Estimates of genetic differentiation measured by F_{ST} do not necessarily require large sample sizes when using many SNP markers. Plos One (7) 8: e42649.

Xanthopoulou, A. Ganopoulos, I. Koubouris, G. Tsaftaris, A. Sergendani, C. Kalivas, A. Madesis, P. 2014. Microsatellite high-resolution melting (SSR-HRM) analysis for genotyping and molecular characterization of an *Olea europea* germplasm collection. Plant Genetic Resources 12(3): 273-277.

Yumnam, J. S., Tyagi, W., Pandey, A., Meetei, N. T., & Rai, M. 2012. Evaluation of genetic diversity of chilli landraces from North Eastern India based on morphology, SSR markers and the *Pun1* locus. Plant Molecular Biology Reporter, 30(6): 1470-1479.

CAPÍTULO II. HEREDABILIDAD DE CARACTERES VEGETATIVOS Y ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN EN AJÍ TABASCO (*Capsicum frutescens*: SOLANACEAE)

Resumen

El ají Tabasco es una variedad de *Capsicum frutescens* con alto potencial económico a nivel mundial debido a su grado de pungencia y productividad. En Colombia se han desarrollado cultivos productivos a través de la selección direccional de características de interés comercial. No obstante, estos procesos se han realizado sin conocer la proporción en que los caracteres elegidos son susceptibles a generar un cambio deseado tras el proceso de selección y la diversidad genética presente. En este estudio se estimó la heredabilidad en sentido estricto h^2 , para caracteres vegetativos y caracteres asociados a la producción en un cultivo de *Capsicum frutescens* variedad ají Tabasco a través del modelo de regresión progenitor-progenie. Se realizó la amplificación de marcadores moleculares microsatélites para estimar heterocigosidad observada y esperada, endogamia, y número de perfiles genéticos presentes. También se valoró si la repetibilidad podría utilizarse para este cultivo como un parámetro auxiliar de la heredabilidad. Se obtuvo que la heredabilidad para las características vegetativas y asociadas a producción en el cultivo evaluado fue de cero, causada posiblemente por la fuerte incidencia del componente ambiental en todos los rasgos medidos, ausencia de variabilidad genética, alto grado de homocigosis, endogamia total del cultivo y una alta similitud genética entre todos los individuos. La repetibilidad aunque fue consistente en ambas generaciones de cultivo no obtuvo valores cercanos a las estimaciones de heredabilidad, por lo que no se recomienda su uso como parámetro predictivo. Los resultados obtenidos indican que este cultivo de ají Tabasco ha alcanzado su máxima respuesta genética y no contiene variabilidad para proceder con procesos de

selección, no obstante se recomienda evaluar este tipo de variedades en diferentes tratamientos y ambientes para conocer su plasticidad fenotípica. Debido a la historia de vida del género *Capsicum*, los resultados del presente estudio pueden ser de utilidad para predecir el comportamiento frente a selección de especies y variedades relacionadas.

Palabras clave: Ají, Diversidad Genética, Regresión Progenitor-Progenie, Respuesta A Selección.

Abstract

Tabasco pepper is a variety of *Capsicum frutescens* with high economic potential worldwide due to its pungency and productivity. In Colombia, productive crops have been developed by directional selection of traits of commercial interest. However, these processes have been developed without knowledge of the extent to which the chosen traits will manifest after selection or of the present genetic diversity. This study estimated narrow-sense heritability (h^2) for vegetative and productive traits in a crop of *C. frutescens* var. Tabasco by parent-offspring regression. Microsatellite molecular markers were amplified to estimate observed and expected heterozygosity, inbreeding, and the number of genetic profiles present. The study also assessed whether repeatability could be used for this crop as an auxiliary parameter for heritability. Heritability for vegetative and productive traits in the evaluated crop was zero, likely resulting from the strong influence of the environmental component in all measured traits, the absence of genetic variance, a high degree of homozygosity, crop inbreeding, and high genetic similarity among all individuals. Although repeatability was consistent in both crop generations, its values were

not similar to the estimated heritabilities; thus, its use as a predictive parameter is not recommended. The results show this line of Tabasco pepper has reached its maximum genetic response and does not contain variance to proceed with selection processes; however, these varieties should be evaluated under different treatments and environments to assess their phenotypic plasticity. Because of the life history of the genus *Capsicum*, the results of this study may be useful in predicting behavior in the selection of species and their related varieties.

Keywords: Chili, Genetic diversity, Parent-offspring regression, Response to selection.

INTRODUCCIÓN

El ají es una de las ocho hortalizas más cultivadas en el mundo (Segovia & Romero 2007), registrando según FAOSTAT (2018) una superficie cultivada de 1938788 hectáreas, con una producción de 34497462 toneladas en 2016, siendo China, México y Turquía los principales países productores a nivel mundial. La demanda alta del ají es debida a la pungencia, característica única del género *Capsicum* ocasionada por la presencia de compuestos alcaloides del grupo capsaicinoides, presentes en la placenta de los frutos maduros (Aguilar *et al.* 2013). Aunque en Colombia el consumo de ají es menor en comparación con otros países de Latinoamérica, su producción se ha incrementado desde el 2008, tanto así que para el 2011, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural destaca la producción de ají por su gran incremento en las exportaciones (Restrepo 2011). Colombia tiene la oportunidad de ocupar un puesto importante a nivel mundial con el incremento de áreas de producción, la mejora de la calidad y nuevas presentaciones industriales, entre otras (Silva 2011), por esas razones el ají se convierte en un cultivo prioritario para el desarrollo agrario del país.

La variedad de ají “Tabasco” pertenece a la especie *Capsicum frutescens* y se caracteriza por tener hojas pequeñas, ramificación temprana del tallo, flores blancas y un fruto alargado, siendo de gran interés económico debido a su productividad y contenido de capsaicina, que es el principal compuesto capsaicinoide responsable de la sensación de pungencia (Leete & Loudon 1968, Garcés-Claver *et al.* 2006, Cautinho *et al.* 2015). En los cultivos colombianos de ají Tabasco es usual encontrar una alta variabilidad de los rasgos vegetativos y productivos, los cuales podrían ser usados para “mejorar” algunos de ellos a través de selección direccional. Sin embargo, antes de considerar un programa de selección,

es necesario conocer primero en qué proporción estos rasgos son heredables. Para esto, se debe considerar que la expresión fenotípica del cultivo es resultado de la suma de diferentes factores a nivel poblacional que pueden ser determinados por diseños experimentales. Estos diseños experimentales están basados en un modelo aditivo lineal [1] en el cual la variabilidad fenotípica o varianza fenotípica, se refiere a la varianza total de las mediciones de la característica de interés y es definida como la sumatoria de los componentes de varianza genética aditiva σ_A^2 , varianza genética dominante σ_D^2 , varianza de interacción génica (epístasis) σ_I^2 y la varianza ambiental σ_E^2 (Falconer & Mackay 1996).

$$\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2 + \sigma_E^2 \quad [1]$$

Sin embargo, solo los valores de varianza genética aditiva llevan el potencial heredable de los parentales. Razón por la cual la proporción de la varianza total de un rasgo en la población a un tiempo o edad particular que es atribuible a los valores de varianza genética aditiva, es formalmente considerada como heredabilidad en sentido estricto y es denotada por h^2 [2] (Visscher *et al.* 2008).

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} \quad [2]$$

La heredabilidad en sentido estricto, o simplemente heredabilidad, puede estimarse sobre las mediciones de un carácter a partir de diversos modelos matemáticos, siempre y cuando se conozca el grado de parentesco entre individuos (Arilla 1998). La regresión progenitor-progenie es un modelo ampliamente utilizado para estimar la heredabilidad y consiste en comparar mediante un análisis de regresión, mediciones del carácter de interés en padres e hijos. Entre más familias sean incluidas en el análisis (pares de padres e hijos), mayor será

la precisión de la estimación (Falconer & Mackay 1996). La predicción de cómo la selección direccional actúa sobre la media de un rasgo particular de acuerdo con su heredabilidad es llamado respuesta a selección y es denotado por R_S [3], donde i es la intensidad de selección y σ_p es la desviación fenotípica estándar $\sqrt{\sigma_p^2}$ (Falconer & Mackay 1996).

$$R_S = ih^2\sigma_p \quad [3]$$

Debe resaltarse que la heredabilidad al depender de las frecuencias alélicas, es influenciada por la endogamia y la diversidad genética, siendo imprescindible conocer estos valores en cultivos de interés para obtener interpretaciones confiables de la heredabilidad. La endogamia y la diversidad genética de un conjunto de individuos pueden extraerse a partir de la amplificación de marcadores moleculares codominantes como los microsatélites.

Otro parámetro usualmente estimado para conocer en qué proporción un rasgo puede ser heredable es la repetibilidad R . Consiste básicamente en analizar mediciones de un carácter que pueda tener repetición temporal o espacial en los individuos (Falconer & Mackay 1996). En algunos casos, el valor de repetibilidad resulta ser una aproximación confiable al valor de heredabilidad, lo que lo puede convertir en un parámetro predictivo que es experimentalmente más sencillo de obtener.

Las estimaciones de los anteriores parámetros genéticos en los cultivos, permiten conocer hasta qué punto un cultivo o variedad puede responder a selección sobre una característica en particular, y ayuda a determinar la pertinencia de futuros programas de direccionamiento genético. En el presente estudio se estimaron los valores de heredabilidad para

rasgos vegetativos y asociados a la producción de un cultivo de ají Tabasco en Colombia, para el cual una amplia variabilidad fenotípica ha sido observada en campo y en el cual su diversidad genética permanece desconocida. Esto con el objetivo de conocer si un “mejoramiento” de los rasgos podría ser posible. La repetibilidad de algunos rasgos con repetición espacial también fue estimada para determinar si podría ser utilizada como un parámetro alternativo que describiese la heredabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y área de siembra

El material vegetal evaluado consistió en plantas de la variedad de ají Tabasco 08 (*C. frutescens*), cultivada por la empresa Hugo Restrepo y Cía. La siembra del material vegetal se desarrolló en el área contigua al Laboratorio de Aguas y Suelos de la Escuela de Ingeniería Agrícola de la Universidad del Valle en Cali-Colombia, coordenadas geográficas 3° 22' 22.23'' N y 76° 31' 47.82'' O.

Siembra y mantenimiento del cultivo

El área experimental fue arada para cada cultivo con ayuda de un tractor y se elaboraron surcos de 0.6 m de ancho. Las distancias de siembra entre plantas del mismo surco fueron de 0.35 m y entre plantas de surcos contiguos de 1.5 m. La siembra de plántulas de ají Tabasco se realizó a los 40 días después de su germinación en invernadero. Se implementó un sistema de riego por goteo con aperturas en las cintas de riego cada 10 cm. El riego se realizó diariamente durante todas las etapas del cultivo, salvo en temporadas de lluvia. El mantenimiento agronómico consistió en aplicaciones foliares mensuales preventivas de una mezcla de acaricida, insecticida, fungicida y bactericida, y solo cuando fue estrictamente necesario aplicaciones de un agroinsumo en específico. Mensualmente, se realizó fertilización edáfica de nutrientes mayores y menores (relación 5 a 1) a cada planta mensualmente, con 5 g de la mezcla de fertilizantes a 5 cm de la raíz. Las plantas acompañantes que aparecían entre surcos y a dos metros alrededor de los cultivos, se erradicaron permanentemente de forma manual.

Variables de medición

Caracteres vegetativos: después de la siembra se midieron mensualmente la altura de la planta y grosor del tallo en la base. En el quinto mes se realizó la medición del largo y el ancho a diez hojas por planta, cinco hojas apicales y cinco hojas basales. Se realizó el conteo del número de ramas con frutos por planta.

Caracteres asociados a la producción: durante la etapa de crecimiento se registró el número de días a la primera flor después de la siembra. En el quinto mes de cultivo se realizó el conteo del número de frutos por cada rama y total por planta. Se escogieron cinco frutos al azar por planta para mediciones de largo, diámetro, peso promedio y número de semillas. La productividad por planta fue estimada a partir del producto entre el número de frutos y peso promedio del fruto por cada planta.

Parámetros como la media, mediana, desviación estándar, varianza, valores máximos y mínimos y coeficiente de variación fueron estimados del cultivo de plantas parentales.

Estimación de la heredabilidad

Para la estimación de la heredabilidad en sentido estricto h^2 se aplicó el modelo de regresión progenitor-progenie descrito en Falconer & Mackay (1996). Con base en este modelo se realizó la siembra de dos cultivos; el primero (plantas progenitoras) entre septiembre de 2016 a febrero de 2017 y el segundo (plantas descendientes o progenies) entre julio de 2017 y enero de 2018. El diseño experimental consistió en la evaluación fenotípica de familias, donde cada familia estuvo representada por una planta parental (progenitora) y una planta descendiente (progenie). La posición de siembra de cada planta

en el área experimental fue aleatorizada para los dos ciclos de cultivo con el objetivo de equilibrar el efecto de las condiciones externas no controlables. La heredabilidad fue estimada como $h^2 = \frac{1+F}{2} b$ donde la fracción corresponde al coeficiente de los efectos génicos aditivos descrita por Becker (1984) cuando hay endogamia F , y b a la pendiente del análisis de regresión para cada característica. El ajuste de los datos al modelo fue evaluado con el coeficiente de determinación r^2 .

La repetibilidad R fue estimada para los rasgos que presentaron repetibilidad espacial en los individuos, tales como: número de frutos de las cuatro ramas con más frutos, largo y ancho de las hojas apicales y basales, y para los cinco frutos escogidos al azar; el largo, el diámetro y el peso. La estimación de la repetibilidad se realizó a partir del despeje de los cuadrados medios del análisis de varianza de una vía descrito por Molina (1992).

$$\sigma_{ee}^2 = MS_2 \quad [4]$$

$$(\sigma_G^2 + \sigma_{eg}^2) = \frac{MS_1 - MS_2}{r} \quad [5]$$

$$R = \frac{\sigma_G^2 + \sigma_{eg}^2}{(\sigma_G^2 + \sigma_{eg}^2) + \sigma_{ee}^2} \quad [6]$$

Donde σ_{ee}^2 corresponde a la varianza ambiental especial, MS_2 a la media de cuadrados del residual, σ_G^2 a la varianza genotípica calculada a partir de los individuos, σ_{eg}^2 a la varianza ecológica general, MS_1 a la media de cuadrados de la fuente de variación entre individuos y r al número de medidas repetidas.

Extracción de ADN y genotipificación

La diversidad genética del cultivo se estimó amplificando marcadores moleculares microsatélites en 30 plantas parentales del primer ciclo de cultivo escogidas al azar, para las cuales se recolectó 0.2 g de tejido foliar fresco. Se usó el protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle (1987) con las modificaciones de Stewart (1993). Se trituró el tejido foliar y se añadió 500 μ L de solución de homogenización (PVP 2%, NaCl 1.42M, Tris HCL 100 mM, EDTA 0.5M y CTAB 2%). Se transfirió la solución a un tubo de 2.0 mL y se agregó 3 μ L de β -mercaptoetanol, posteriormente se sometió a baño María por 50 min a 65 °C, mezclando por inversión cada 10 min. Finalizada la incubación se añadieron 500 μ L de solución de extracción compuesta de cloroformo: alcohol isoamílico en una relación 24:1 y se mezcló usando vortez. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y posteriormente se transfirieron 400 μ L del sobrenadante a un tubo nuevo, se adicionaron 800 μ L de etanol y se mezcló por inversión 10 veces para homogenizar. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó por inversión en una toalla de papel a temperatura ambiente por tres horas. El botón en el fondo del tubo fue disuelto en 500 μ L de LowTE y almacenado a -20 °C.

Se amplificaron algunos marcadores microsatélites reportados por Lee *et al.* (2004) y por Nagy *et al.* (2007) (Tabla 2.1). El programa de amplificación estuvo compuesto por una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, hibridación (Tabla 2.2) por 30s y extensión a 72°C por 1min; finalizando con una extensión final a 72°C por 5 min. Las condiciones anteriores fueron estandarizadas en el termociclador Biorad T100TM. La discriminación de los alelos se realizó a partir de las curvas de disociación de alta resolución (HRM) de los amplificadores. Para la reacción de

HRM se usó 5 µL de reactivo de Precision Melt Supermix y 0.7 µM de cada cebador (forward y reverse), 35 ng de ADN y 0.1 µL de agua destilada y desionizada para un volumen total de 10 µL. Estas reacciones se realizaron usando el equipo de Biorad CFX96 Real Time System. El análisis de HRM se inició con una desnaturalización a 95 °C por 5 min y luego se disminuyó la temperatura a 60°C por 30 s y finalmente se aumentó la temperatura progresivamente en 0.2 °C por cada ciclo de 10 s para realizar el registro de la fluorescencia hasta llegar a 95 °C. La discriminación de los perfiles de disociación por alelos se hizo a través del software PrecisionMeltAnalysis™ v1.2.

Estimación de la diversidad genética

Se estimó la heterocigosidad observada H_o y esperada H_e por *locus* y se utilizó el valor promedio de todos los *loci* para el cálculo de la endogamia $F = 1 - \frac{\bar{H}_o}{\bar{H}_e}$. Además se identificó el número de perfiles genéticos presentes en la muestra.

Tabla 2.1. Marcadores microsatélites utilizados en este estudio y la secuencia de sus cebadores, los marcadores denominados como Ng corresponden a los diseñados por Nagy *et al.* (2007) y los Bd a los diseñados por Lee *et al.* (2004).

SSR	Locus	Cebador (5'-3')	
		Forward	Reverse
Ng8	CA516044	atcttcttctcatttctcccttc	tgctcagcattaacgacgtc
Ng10	CA516334	accacacctcatcaacaacc	atttgtggcttttcgaaacg
Ng15	CA515055	taatcgagcggtagattcgg	taagtggagggtgcccttctg
Ng18	CA517699	acgccaagaaaatcatctcc	ccattgctgaagaaaatggg
Ng33	CA516439	gacagcttttcaagaactagagagag	tggagcaaacacagcagaac
Bd3	Hpms1-173	tgctgggaaagatctcaaaagg	atcaaggaagcaaaccaatgc
Bd17	Hpms1-165	ggctatttccgacaaaccctcag	ccattggtgttttactgttgtg
Bd22	Hpms1-214	tgcgagtaccgagttcttctag	ggcagtcctgggacaactcg

Tabla 2.2. Temperatura de hibridación y número de ciclos usados en la amplificación de los sistemas microsatélites. La letra a, equivale a protocolos con disminución de 1°C durante los primeros 5 ciclos de amplificación.

SSR	Temperatura de hibridación	Ciclos	Temperatura de hibridación	Ciclos
Ng8	60.0	40		
Ng10	60.0	40		
Ng15	63.0 ^a	5	61	35
Ng18	65.0 ^a	5	60	35
Ng33	60.0	40		
Bd3	58.1	40		
Bd17	54.0	40		
Bd22	58.0	40		

RESULTADOS

La media y la mediana de los rasgos fue similar en muchos casos excepto para los rasgos “número de frutos” y “productividad”. Estos dos rasgos presentaron la mayor variabilidad, evidente en parámetros como desviación estándar, varianza, valores máximos, valores mínimos y coeficiente de variabilidad (Tabla 2.3). Para todos los rasgos, los datos fenotípicos de los progenitores y progenies tuvieron valores de pendiente bajos o negativos, y los datos no se ajustaron a una regresión lineal (Figuras 2.1-3). Los sistemas de microsatélites usados para estimar la variabilidad genética evidenciaron tres perfiles genéticos (Tabla 2.4), con una heterocigosidad observada de cero para todos los *loci*, y un promedio de heterocigosidad observada de 0.024 ± 0.046 , evidenciando una endogamia total en el cultivo ($F = 1$) debido a la ausencia de individuos heterocigotos. Así que siguiendo el coeficiente de Becker (1984), la heredabilidad fue estimada como el valor de la pendiente $h^2 = b$. Estos valores de heredabilidad cercanos a cero (Tabla 2.5) muestran que la variabilidad observada en este cultivo evidente en la (Tabla 2.3), es producto de factores ambientales y no pueden responder a selección direccional. Aunque la repetibilidad espacial fue consistente entre las dos generaciones de plantas, este parámetro no fue cercano al de heredabilidad (Tabla 2.5).

Tabla 2.3. Parámetros estadísticos estimados para 244 plantas parentales del primer ciclo de cultivo de ají Tabasco.

	Media	Error Estándar	Mediana	Varianza σ_p^2	Max.	Min.	C.V.
Altura del tallo, mes 4	105.31	1.14	105.00	403.60	167.00	16.00	0.19
Ancho del tallo, mes 4	2.67	0.04	2.63	0.60	4.90	0.96	0.29
Número de ramas	8.63	0.16	9.00	8.05	15.00	1.00	0.33
Días a la primera flor	56.56	0.35	57.00	30.19	82.00	37.00	0.10
Largo de hojas apicales	4.81	0.05	4.67	0.87	12.41	2.87	0.19
Ancho de hojas apicales	7.12	0.07	7.16	1.42	10.54	2.40	0.17
Largo de hojas basales	2.60	0.02	2.57	0.20	6.25	1.67	0.17
Ancho de hojas basales	3.63	0.03	3.62	0.29	5.04	1.74	0.15
Número de frutos	435.05	16.52	389.00	84962.16	1822.00	6.00	0.67
Productividad	444.62	19.58	379.11	105112.32	1898.34	3.71	0.73
Largo del fruto	3.07	0.01	3.08	0.05	3.57	2.50	0.07
Ancho del fruto	0.87	0.00	0.87	0.00	1.01	0.71	0.06
Peso del fruto	1.00	0.00	1.01	0.02	1.33	0.49	0.14

Tabla 2.4. Perfiles genéticos muestreados y tipos de curvas HRM para cada marcador encontradas a través de la amplificación de marcadores moleculares microsatélites para una muestra de 30 plantas de ají Tabasco correspondientes a la generación de parentales. Las letras a y b corresponden a los diferentes alelos obtenidos en cada sistema.

Perfil genético	Ng8	Ng10	Ng15	Ng18	Ng33	Bd3	Bd17	Bd22	Número de Individuos
1	a	a	a	a	a	a	a	a	27
2	a	a	a	a	a	a	a	b	2
3	a	a	b	a	a	a	a	a	1

Tabla 2.5. Heredabilidad en sentido estricto h^2 y valores de repetibilidad espacial R de caracteres vegetativos y asociados a la producción para un cultivo de *C. frutescens* variedad Tabasco. Para la heredabilidad en sentido estricto n es el número de familias utilizado para la estimación, y para la repetibilidad n es el número de individuos utilizados para la estimación en cada generación.

Caracter	h^2		R en progenitores		R en progenies	
	n		n		n	
Altura del tallo Mes 1	244	-0.01 $\pm$ 0.03				
Altura del tallo Mes 2	244	-0.06 $\pm$ 0.04				
Altura del tallo Mes 3	244	0.00 $\pm$ 0.04				
Altura del tallo Mes 4	244	0.02 $\pm$ 0.04				
Ancho del tallo Mes 1	244	-0.07 $\pm$ 0.03				
Ancho del tallo Mes 2	244	0.00 $\pm$ 0.01				
Ancho del tallo Mes 3	244	0.00 $\pm$ 0.00				
Ancho del tallo Mes 4	244	0.00 $\pm$ 0.00				
Número de ramas	254	-0.03 $\pm$ 0.06				
Día a la primera flor	192	-0.26 $\pm$ 0.11				
Largo de hojas apicales	248	-0.02 $\pm$ 0.12	248	0.34 $\pm$ 0.02	227	0.22 $\pm$ 0.02
Largo de hojas basales	248	0.00 $\pm$ 0.00	248	0.27 $\pm$ 0.02	227	0.45 $\pm$ 0.02
Ancho de hojas apicales	248	0.00 $\pm$ 0.00	248	0.32 $\pm$ 0.02	227	0.46 $\pm$ 0.02
Ancho de hojas basales	248	-0.01 $\pm$ 0.01	248	0.28 $\pm$ 0.02	227	0.63 $\pm$ 0.02
Número de frutos	318	-0.02 $\pm$ 0.05	314	0.22 $\pm$ 0.02	233	0.40 $\pm$ 0.02
Productividad	221	-0.04 $\pm$ 0.03	256	0.27 $\pm$ 0.02	224	0.45 $\pm$ 0.01
Largo del fruto	207	-0.13 $\pm$ 0.08	284	0.31 $\pm$ 0.01	238	0.35 $\pm$ 0.01
Ancho del fruto	207	0.13 $\pm$ 0.10	284	0.31 $\pm$ 0.01	238	0.35 $\pm$ 0.01
Peso del fruto	207	0.00 $\pm$ 0.00	293	0.32 $\pm$ 0.01	243	0.36 $\pm$ 0.01

DISCUSIÓN

El cultivo de ají Tabasco evaluado mostró una variabilidad similar en varios rasgos vegetativos y reproductivos de acuerdo con el coeficiente de variación. Este tipo de variación es esperada debido a que son plantas de una variedad establecida. Sin embargo, se estimaron altos coeficientes de variación en los rasgos “número de frutos” y “productividad”. Esta gran variabilidad se evidenció en los valores máximos y mínimos, por ejemplo, para el número de frutos, se reportó una planta con 1822 frutos y otra con tan solo 6 (Tabla 2.3). Estas grandes diferencias entre fenotipos en rasgos comerciales son extremadamente interesantes para agricultores y mejoradores que deseen realizar selección direccional en su cultivo o incrementar la producción, dado que tendrían una buena proporción de desviación estándar fenotípica σ_p para obtener una considerable respuesta a selección R_s [3]. Sin embargo, otro parámetro también es necesario para obtener la respuesta deseada y este es la heredabilidad del rasgo. Si la heredabilidad es alta, el rasgo seleccionado tendrá una respuesta considerable a selección en la siguiente generación, pero si esta es baja, el proceso de selección no tendrá el efecto deseado.

En experimentos que estiman la heredabilidad en sentido estricto por regresión, es necesario evaluar tantas familias como sea posible, puesto que la precisión de la estimación incrementa cuando el error estándar decrece (Falconer & Mackay 1996). Para este estudio, el número de familias evaluado para cada rasgo vegetativo o productivo fue suficiente para obtener una estimación precisa debido a que los errores estándar para todos los rasgos fueron bajos (Tabla 2.5). Los valores de pendientes cercanos a cero o negativos y el no ajuste de los datos a la regresión lineal indican que no hay relación directa entre los valores fenotípicos de los padres y de los hijos, puesto que para caracteres vegetativos como en los

asociados a la producción no se observó una relación entre los datos. Por ejemplo, para el carácter vegetativo “altura del tallo”, los datos mostraron que las plantas progenitoras con tallos más altos pueden tener descendencia con tallos bajos y plantas con tallos bajos pueden tener descendencia con tallos altos. Lo mismo ocurre en caracteres asociados a la producción, como por ejemplo los datos para “número de frutos”, las plantas progenitoras con muchos frutos pueden tener descendencia con muy pocos frutos y las plantas con pocos frutos tener descendencia con muchos frutos. Esta ausencia de tendencia y ajuste de los datos al modelo, demuestra que el factor familia no tiene un efecto significativo en los caracteres estudiados.

Los marcadores microsatélites mostraron una baja diversidad genética en el cultivo de ají Tabasco evaluado, para el cual muchos individuos compartieron el mismo perfil genético y en donde individuos con diferentes perfiles se diferenciaron solo en un 10% (Tabla 2.4). La ausencia de individuos heterocigotos en los *loci* amplificados es consistente con los altos grados de autogamia (entre 0.90 y 0.95) reportados para *Capsicum* (Justino *et al.* 2018). Estos niveles de endogamia son explicados por la receptividad del estigma al polen antes del tiempo de floración (Bosland 1993). Bajos niveles de heterocigosidad también son encontrados en bancos de germoplasma y especies silvestres de ají, como lo reportan González *et al.* (2014), Lee *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2016). En poblaciones diploides con apareamiento al azar, las heterocigosidades esperadas equivalen a dos veces el producto de las frecuencias alélicas (Falconer & Mackay 1996), por lo que se espera que su valor sea más alto que la heterocigosidad observada en poblaciones altamente autógamas, demostrando así un evidente exceso de homocigotos. El valor de endogamia $F = 1$ reportado en este estudio, es consecuencia de la ausencia de individuos heterocigotos,

indicando que efectivamente los individuos evaluados son producto de la autopolinización recurrente del material estudiado. Este valor de endogamia ayudó a ajustar la heredabilidad de acuerdo con el coeficiente de efectos genéticos aditivos de Becker (1984) para poblaciones con endogamia, razón por la cual la heredabilidad fue estimada como la pendiente de la regresión para todos los rasgos.

La heredabilidad fue cercana a cero o negativa para ambos rasgos vegetativos y productivos, lo cual indica que la proporción de la varianza genética aditiva del cultivo respecto a la varianza fenotípica es muy reducida. Además, la ausencia de heterocigotos elimina la proporción de varianza de dominancia, y la varianza de interacción o epístasis suele ser muy pequeña para tener un efecto importante (Simmons & Crow 1977, Barker 1979, Crow 1987). Por tanto, estos factores son descartados y la varianza ambiental queda como el único factor que puede explicar la gran varianza fenotípica observada entre individuos. Los valores nulos de heredabilidad en el cultivo evaluado, indican que ni los caracteres vegetativos ni los asociados a la productividad, responderán a la selección direccional para el “mejoramiento” del cultivo, entendiendo mejoramiento como el avance deseado en aumento o disminución en una próxima generación para la característica seleccionada (Falconer & Mackay 1996).

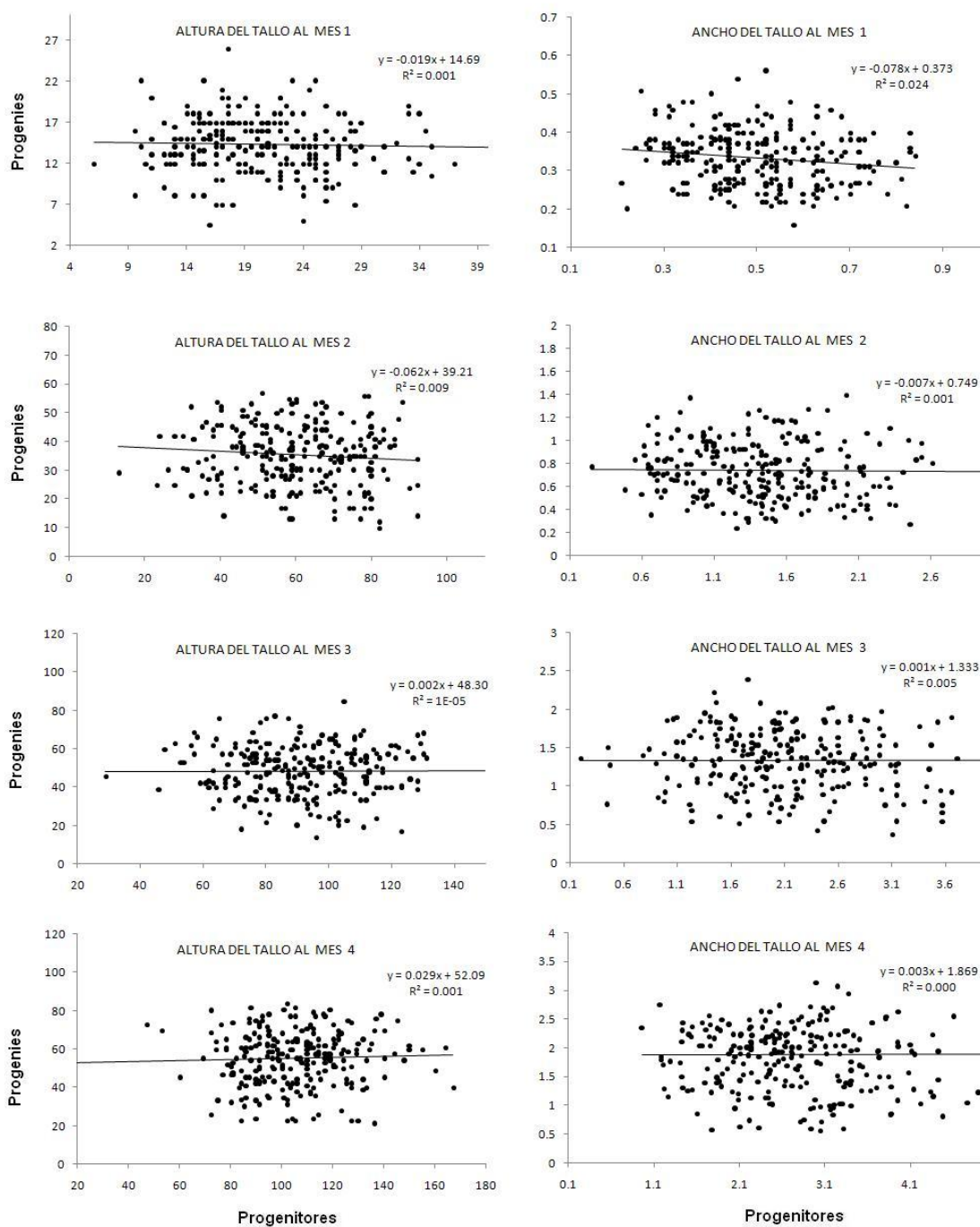


Figura 2.1. Regresiones progenitor-progenie de la altura y ancho del tallo de una línea comercial de ají Tabasco *C. frutescens* durante 4 meses después de la siembra.

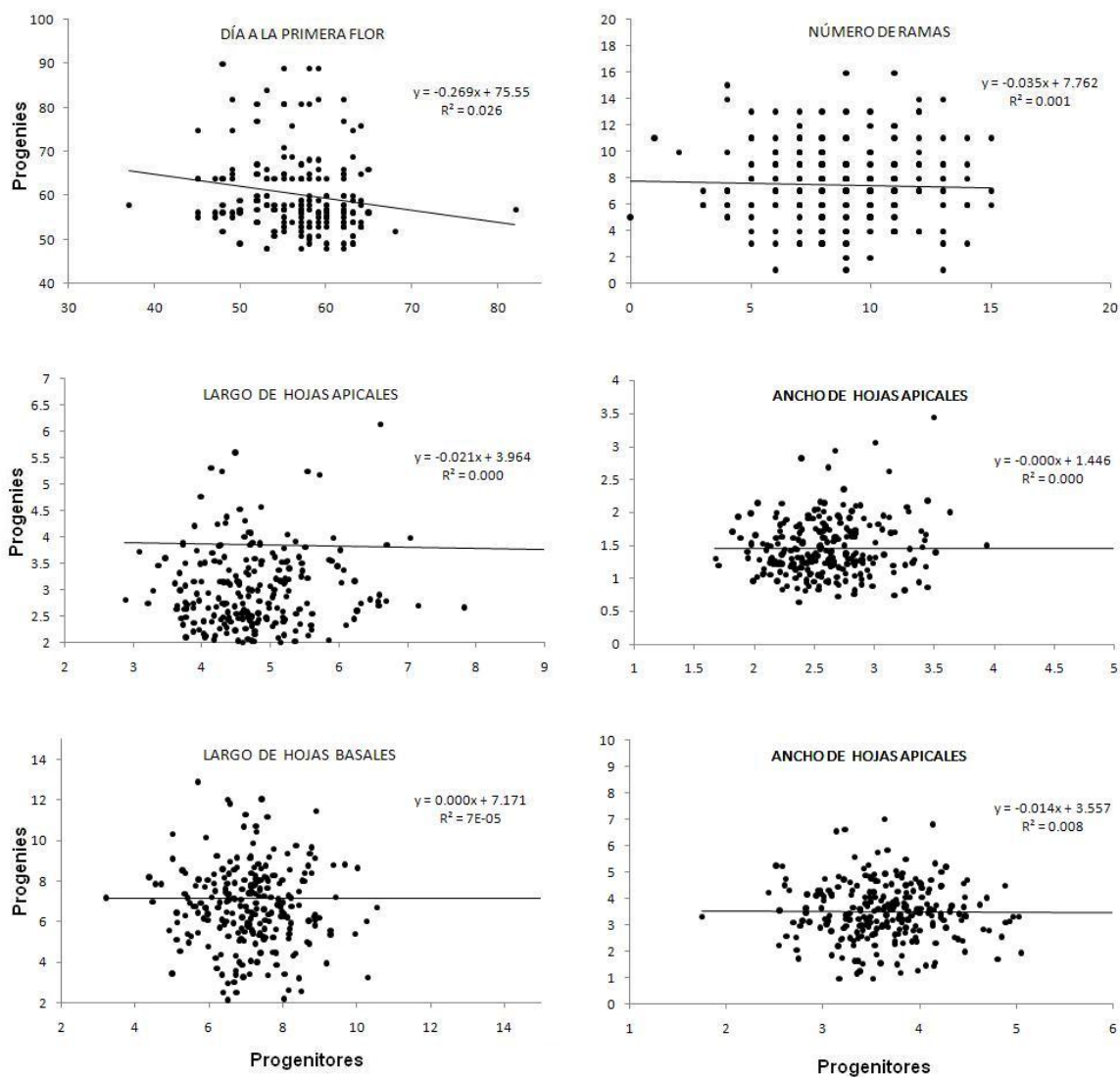


Figura 2.2. Regresiones progenitor-progenie del día a la primera flor y caracteres vegetativos de una línea comercial de ají Tabasco *C. frutescens*.

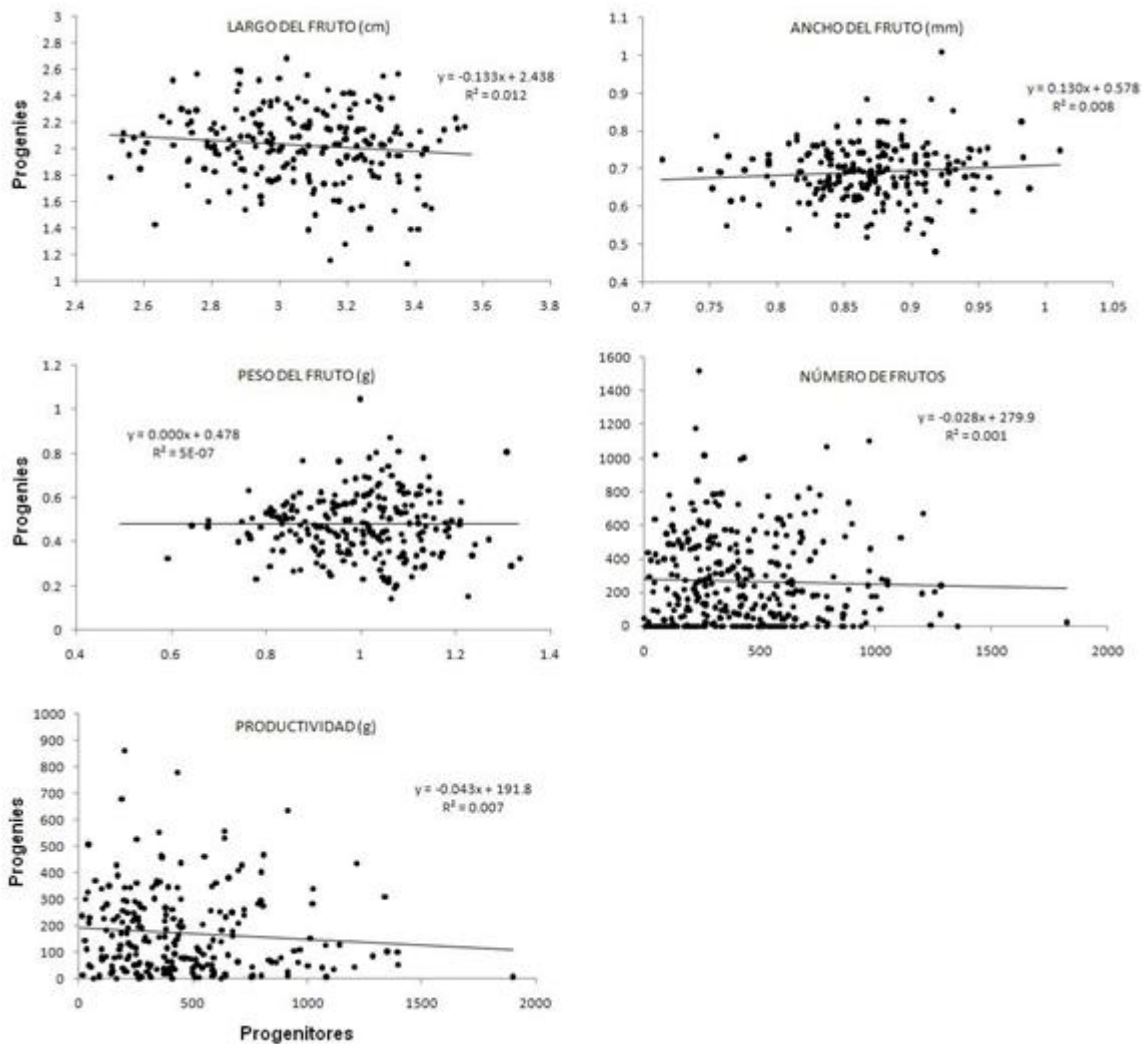


Figura 2.3. Regresiones progenitor-progenie de caracteres asociados a la producción de una línea comercial de ají Tabasco *C. frutescens*.

En diferentes especies del género *Capsicum* se han reportado valores altos de heredabilidad en sentido amplio H^2 para muchas de las características que fueron evaluadas en este estudio (Sreelathakumary & Rajamony 2004, Pandit & Adhikary 2014, Naegele *et al.* 2016, Rosmania *et al.* 2016, Chakrabarty & Aminul-Islam 2017, Singh *et al.* 2017). No obstante, estas estimaciones de heredabilidad en sentido amplio, a diferencia de la heredabilidad en sentido estricto h^2 , suelen ser sobreestimaciones debido a que incluyen la varianza de dominancia y la varianza de interacción (epístasis), siendo $H^2 = \sigma_G^2 / \sigma_P^2 = (\sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2) / \sigma_P^2$. Además, se realizan generalmente para un grupo heterogéneo de genotipos que habitualmente presentan valores fenotípicos diferentes, lo que precisamente incrementa la varianza génica aditiva, algo esperado puesto que se desarrollan las estimaciones sobre materiales vegetales provenientes de diferentes regiones geográficas. Tan solo Rodríguez *et al.* (2008), Stommel (2008) y Santos *et al.* (2014) evaluaron la heredabilidad en sentido amplio y en sentido estricto, mostrando unos valores de H^2 muy elevados respecto a los de h^2 . En resumen, la metodología implementada y el material vegetal de diferente origen geográfico, parecen estar sobreestimando los valores de heredabilidad de estos estudios, pues son calculados en función de genotipos muy diferentes por lo que deben interpretarse en función de la diversidad genética.

Para el cultivo de ají Tabasco estudiado, los valores de repetibilidad del largo y ancho de hojas apicales y basales, número de frutos, peso del fruto, largo y ancho del fruto y productividad, fueron consistentes cuando fueron evaluados independientemente en plantas parentales y progenies, mostrando una media del 35%. El porcentaje restante es explicado por la varianza ambiental conocida como varianza ambiental específica σ_{ee}^2 (Molina 1992). Sin embargo, cuando se examinan estos valores de repetibilidad y se considera que la

σ_A^2 experimental fue nula de acuerdo con el análisis de regresión progenitor-progenie, se puede concluir que la mayoría de la varianza fenotípica del cultivo es debida a efectos ambientales debido a la escasa diversidad genética del cultivo y la alta similitud entre las plantas como lo muestran los análisis de marcadores moleculares. Aunque la repetibilidad fue consistente en ambas generaciones, estos valores no fueron cercanos a los de heredabilidad, por tanto, su uso como parámetro predictivo no es recomendado.

Las especies del género *Capsicum* tienen una historia de vida similar y altos grados de autogamia (Bosland 1993). Los resultados obtenidos para ají Tabasco, pueden ser utilizados para predecir el comportamiento que las demás especies del género tendrían en procesos de selección. *Capsicum* tiene un potencial muy alto para responder a selección en grupos altamente diversos cuando se realiza el direccionamiento sobre caracteres cuantitativos en pocos individuos, haciendo que la respuesta a selección sea rápida en las primeras generaciones. No obstante, su diversidad genética se ve erosionada rápidamente por los altos niveles de endogamia producto de las altas tasas de autofecundación de estas plantas, ocasionando la fijación rápida de los alelos expresada en diferentes combinaciones de individuos homocigotos.

Se recomienda a los agricultores y mejoradores genéticos realizar estimaciones de diversidad genética con marcadores moleculares a sus bancos de semillas para conocer en primera instancia la diversidad genética y si es conveniente proceder con programas de inventario fenotípico y selección de progenitores. Si la valoración molecular no es una alternativa disponible, se recomienda conocer el pedigrí o el parentesco de las plantas del cultivo, dado que con esta información se puede predecir que cultivos descendientes de

pocas plantas parentales tendrán una diversidad genética reducida similar a la reportada por este estudio y no tendrán potencial para direccionamiento genético.

La presente investigación demostró la fuerte influencia del ambiente en las respuestas fenotípicas, por lo que las prácticas de manejo, suelo, fertilización, riego, factores climáticos, etc. son los responsables de la expresión fenotípica de crecimiento y producción en el cultivo evaluado. Finalmente, se recomienda utilizar la alta homogeneidad genética de este tipo de cultivos para diseñar experimentos dirigidos a distinguir cuales son las condiciones y tratamientos específicos que los favorecen a través del estudio de su plasticidad fenotípica.

REFERENCIAS

- Aguilar, F. Aguilar, B. García M. A. 2013. Análisis de medias generacionales para estimar parámetros genéticos de rendimiento en una cruce de pimentón y ají Cayene (*Capsicum annuum*). Acta agronómica 62 (1): 73-78.
- Arilla, J. P. (1998), Notas sobre teoría de mejora genética, Vol. 49, Univ. Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Becker, W A. 1984. Manual of Quantitative Genetics 4th edn, Academic Enterprises, Pullman, Washington.
- Bosland, P.W. 1993. An effective plant field-cage to increase the production of genetically pure chile (*Capsicum* spp.) seed. HortScience Vol28. 1053pp.
- Chakrabarty, S. Aminul-Islam A. K. M. 2017. Selection criteria for improving yield in chili (*Capsicum annuum*). Advances in Agriculture 9 pp.
- Coutinho, J. Barbero, G. F. Avellán, O. F. Garcés-Claver, A, Godoy, H. Palma, M. Barroso, G. 2015. Use of multivariate statistical techniques to optimize the separation of 17 capsinoids by ultra performance liquid chromatography using different columns. Talanta 134: 256-263.
- Dohm, M. R. 2002. Repeatability estimates do not always set an upper limit to heritability. Functional Ecology 16: 273-280.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. Phytochemical Bulletin 19:11-15.
- FAO STAT. 2018. Estadísticas de la FAO. Consultado en: Abril 20 de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Falconer DS, Mackay FC. 1996. Introducción a la Genética Cuantitativa. Zaragoza: 17 Editorial Acribia, S.A.
- Garcés-Claver, A. Arnedo-Andrés, M. S. Abadí, J. Gil-Ortega, R. Álvarez-Fernández, A. 2006. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 9303-9311.
- González P, Garcés, C. Mallor, C. Miera, L. Fayos, O. Pomar, F. Silvar, C. 2014. New insights into *Capsicum* spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain. PloS one. Vol 9 (12).

Justino, E.V. Fonseca, M.E.N. Ferreira, M.E. Boiteux, L. S. Silva, P.P. Nascimento, W.M. 2018. Estimate of natural cross-pollination rate of *Capsicum annuum* using a codominant molecular marker associated with fruit pungency. *Genetics and Molecular Research* 17(1): gmr16039887.

Lee J. M., Nahm S.H., Kim Y.M., and Kim B.D., 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite *loci* in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 619-627

Lee, H., oo, N., Jeong, H., Kwon, J., Jo, J., Ha, Y., Jung, A., Han, J., Veakatasi, J. and Kang, B. 2016. Genetic diversity and population structure analysis to construct a core collection from a large *Capsicum* germplasm. *BMC Genetics*. VRI 17. pp 142.

Leete, E. Loudon, M. C. L. 1968. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicumfrutescens*. *Journal of the American Chemical Society* 90(24): 6837-6839.

López, J. E. 2018. Caracterización molecular de tres líneas de *Capsicum chinense* (Solanaceae) mediante microsatélites utilizando la técnica HRM. Tesis de Pregrado. Universidad del Valle. Cali-Colombia.

Marcos-Pérez, D. 2013. Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia. Tesis de maestría. Universidad de Coruña. 46 pp.

Molina, J. D. 1992. Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa (A.G.T. Editor, S.A. México D. F.

Naegel, R. Mitchell, J. Hausbeck, M. 2016. Genetic diversity, population structure and heritability of fruit traits in *Capsicum annuum*. *PLoS ONE* 11(7).

Nagy I., Stágel A., Sasvári Z., Röder M., Ganai M. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 50: 668–688.

Oyama, K., Hernández-Verdugo, S., Sánchez, C., González-Rodríguez, A., Sánchez-Pena, P., Garzón-Tiznado, J. A. & Casas, A. 2006. Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53(3): 553-562.

Pandit, M. K. Adhikary, S. 2014. Variability and Heritability estimates in some reproductive characters and yield in Chilli (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Plant & Soil Science* 3(7): 845-853.

Pardey-Rodríguez, C., García-Dávila, M. A. & Vallejo-Cabrera, F. A. 2009. Evaluación agronómica de accesiones de *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Acta Agronómica 58(1): 23-28.

Restrepo Salazar, J. C (2011) Cadena agroalimentaria de las hortalizas: Indicadores y acciones . Disponible en:<https://sioc.minagricultura.gov.co/Hortalizas/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/002%20-%20Cifras%20Sectoriales%20-%202011%20Marzo.pdf> [Consultado 13-11-2017]

Rodríguez, Y. Depestre, T. Gómez, O. 2008. Eficiencia de la selección en líneas de pimiento (*Capsicum annuum*), provenientes de cuatro sub-poblaciones, en caracteres de interés productivo. Cien. Inv. Agr. 35 (1): 37-49.

Rosmania, Syafrudin, Hasrol, Yanti, Juliyanti, Zulfahmi. 2016. Estimation of variability, heritability and genetic advance among local chili pepper genotypes cultivated in peats lands. Bulgarian Journal of Agricultural Science 22 (3): 431-436.

Santos, R. M. C. Rego, E. R. Borém, A. Nascimento, M. F. Nascimento, N. F. F. Finger, F. L. Rego, M. M. 2014. Epistasis and inheritance of plant habit and fruit quality traits in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). Genetics and Molecular Research 13 (4): 8876-8887.

Segovia, A. Romero, A. 2007. Mejoramiento genético para rendimiento de Chile (*Capsicum annum* L) para consumo en seco en la región centro-sur del Estado Chihuahua, México. Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan 2(3):414-427

Silva, F. 2011. Estimación de parámetros genéticos en el contenido de capsaicina y rendimiento en una cruce de pimentón cultivar serrano y ajacayenne (*Capsicum annuum*) por medio del análisis de medias generacionales. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia

Singh, P. Jain, P. K. Sharma, A. 2017. Genetic variability, heritability and genetic advance in Chilli (*Capsicum annuum* L.) Genotypes. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 6 (9): 2704-2709.

Sreelathakumary, I. Rajamony, L. 2004. Variability, heritability and genetic advance in chilli (*Capsicum annuum* L.). Journal of Tropical Agriculture 42(1-2): 35-37.

Stewart, C. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. Biotechniques 14(5):748-750.

Stommel, J. R. 2008. Inheritance of fruit, foliar, and plant habit attributes in *Capsicum*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133 (3): 396-407.

Rivera, A., Monteagudo, A. B., Igartua, E., Taboada, A., García-Ulloa, A., Pomar, F., Riveiro-Leira, M. & Silvar, C. 2016. Assessing genetic and phenotypic diversity in pepper (*Capsicum annuum* L.) landraces from North-West Spain. Scientia horticulturae, 203: 1-11.

Villela, J. C. B., Barbieri, R. L., Castro, C. M., Neitzke, R. S., De Vasconcelos, C. S., Carbonari, T., Mistura, C. C. & Priori, D. 2014. Caracterização molecular de variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*) com marcadores microssatélites. Horticultura Brasileira 32(2).

Visscher, P. M. Hill, W. G. Naomi, R. W. 2008. Heritability in the genomics era - concepts and misconceptions. Nature Reviews Genetics 9: 255-266.

Yumnam, J. S., Tyagi, W., Pandey, A., Meetei, N. T., & Rai, M. 2012. Evaluation of genetic diversity of chilli landraces from North Eastern India based on morphology, SSR markers and the Pun1 locus. Plant Molecular Biology Reporter, 30(6): 1470-1479.

Zhang, X., Zhang, Z., Gu, X., Mao, S., Li, X., Chadoeuf, J., Palloix, A., Wang, L. Zhang, B. 2016. Genetic diversity of pepper (*Capsicum* spp.) germplasm resources in China reflects selection for cultivar types and spatial distribution. Journal of Integrative Agriculture 15(9): 1991-2001.

CAPÍTULO III. HEREDABILIDAD EN *Capsicum* (SOLANACEAE) USANDO PARENTESCO ESTIMADO CON MARCADORES MOLECULARES¹

Resumen

La heredabilidad es un parámetro genético fundamental para planes de mejoramiento de cultivos, de importancia ecológica y evolutiva, ya que describe si la variabilidad de un carácter se explica mejor por la variación genética o por la ambiental. A pesar de que su estimación deriva de diseños experimentales basados en coeficientes de parentesco conocidos, el uso de técnicas moleculares ha permitido el desarrollo de modelos que permiten estimar la heredabilidad empleando una sola generación, facilitando así los diseños experimentales y la aplicabilidad a poblaciones en las que es complejo conocer las relaciones genealógicas. Con el objetivo de determinar la heredabilidad de rasgos vegetativos y de interés comercial en tres variedades comerciales de ají empleando marcadores moleculares microsatélites, se midieron características fenotípicas vegetativas y reproductivas, y se realizó la genotipificación de los individuos por medio de curvas de disociación de alta resolución (HRM). La heredabilidad para cada rasgo en cada variedad comercial se estimó a partir de una matriz de relaciones de parentesco, obtenida empleando el método Triadic IBD y una matriz de similitud fenotípica. Los rasgos evaluados presentaron valores de heredabilidad cercanos a cero, indicando una fuerte influencia ambiental, y por lo tanto, no es recomendable realizar procesos de selección debido a la poca varianza aditiva con respecto a la fenotípica. Sin embargo, se podrían emplear estas tres variedades comerciales en estudios de rendimiento genotipo-ambiente. Empleando la metodología propuesta se reducen los tiempos de ejecución de los estudios mejoramiento y

¹Trabajo de grado presentado por la estudiante de pregrado Leidy Laura Arias Martínez como requisito parcial para optar al título de Bióloga en la Universidad del Valle

se posibilita la investigación de parámetros genéticos en poblaciones con parentesco desconocido.

Palabras clave: Coeficiente de parentesco, HRM, Microsatélites, Triadic IBD.

Abstract

Heritability is a genetic parameter essential for breeding programs, with ecological and evolutionary importance, because describes if traits variability is caused by the genetic variance or by the environment variance. However, for its estimation, are necessary experimental designs based on knowing the relationship coefficient. Use of the molecular techniques have permitted the development of heritability estimation models using just one generation, which can be useful in populations with relatedness unknown. For determining heritability of vegetative and commercial interest traits in three commercial variety of chili, quantitative traits were evaluated and microsatellites markers were amplified using High Resolution Melting (HRM). The heritability for each trait in each commercial variety was estimated from a matrix of relatedness using the Triadic IBD methodology and a phenotypic similarity matrix. The traits showed heritability values close to zero, indicating that have a strong environmental influence and that it is not advisable to carry out selection processes due to the low additive variance with respect to the phenotypic. Nevertheless, these three varieties could be employed for develop studies centered in the genotype-environment interaction. The methodology used here reduces the time of investigation and allow the estimation of genetic parameter in population with unknown relatedness.

Keywords: HRM, Microsatellites, Relatedness, Triadic IBD.

INTRODUCCIÓN

Capsicum (L.) (Solanaceae) es un género nativo de las regiones templadas y tropicales de América y comprenden frutos dulces (pimientos) y picantes (ají). Se reconocen cerca de 35 especies (Carrizo *et al.* 2013), de las cuales *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* se consideran especies domesticadas y en estas se concentra el mayor interés comercial (Pickersgill 1989, Pickersgill 1997). A nivel global, China e Indonesia son los países con mayor producción, mientras que en América Latina, México es el principal productor (Jäger *et al.* 2013). En Colombia su producción ha venido incrementándose desde el 2008, tanto así que para el 2011, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural destaca la producción de ají por su gran incremento de exportaciones (Restrepo 2011). Según cifras de la Cámara de Comercio de Cali (2015), el Valle del Cauca registra el 93% de las exportaciones de ají, siendo el departamento más importante en producción y exportación de las variedades Tabasco (*C. frutescens*), Habanero (*C. chinense*) y Cayena (*C. annuum*). Esta importancia económica ha conllevado a la realización de trabajos de selección direccional, para los cuales es fundamental conocer qué factores afectan la expresión de algún rasgo en particular.

Previo a realizar un proceso de selección direccional en un cultivo, es necesario conocer parámetros sobre rasgos vegetativos y/o de importancia económica. Los descriptores vegetativos, son fuentes de información sobre el crecimiento y salud de las plantas, mientras que los rasgos reproductivos, como el número de frutos, o días de floración se relacionan de manera directa con los intereses de producción (Gómez & López 2014). La variabilidad de estos descriptores o varianza fenotípica V_P se explica por el modelo cuantitativo en términos de la varianza aditiva V_A , varianza de dominancia V_D , varianza

epistática V_I , y varianza ambiental V_E (Ecuación [1]), siendo la sumatoria de los tres primeros factores la varianza genética V_G (Falconer & Mackay 1996). La estimación de estos componentes es fundamental para determinar diferentes parámetros genéticos, como la heredabilidad.

$$V_P = V_A + V_D + V_I + V_E \quad [1]$$

La heredabilidad en sentido estricto h^2 , se define como la proporción de varianza fenotípica debida a la varianza aditiva (Ecuación [2]) (Visscher *et al.* 2008), siendo V_A estimada a partir del efecto medio de los padres. Dicha varianza explica el componente genético aditivo que afecta el fenotipo de los hijos (Falconer & Mackay 1996), por lo que h^2 se puede explicar en términos prácticos como el grado relativo en el cual un rasgo se transmite de padres a hijos. Por tanto, para un rasgo con h^2 alta, la progenie presenta valores del rasgo semejantes a los de los parentales (Nascimento *et al.* 2012, Naegele *et al.* 2016).

$$h^2 = \frac{V_A}{V_P} \quad [2]$$

Existen diferentes modelos experimentales para estimar la heredabilidad, como la regresión de los hijos sobre el promedio de los padres, la regresión de los hijos sobre uno de los padres o la correlación entre hermanos completos y medios hermanos (Warner 1952, Arilla 1998, Holland *et al.* 2003). Estos modelos requieren un diseño experimental basado en familias y varias generaciones, esto se debe a que es necesario conocer el coeficiente de parentesco r estimado a partir del pedigrí (Falconer & Mackay 1996). El coeficiente de parentesco (r) o coancestría (ϕ) se define como la probabilidad de encontrar genes homólogos idénticos por descendencia en los genotipos (Harris 1964, Jacquard 1972, Wang 2007), por lo que revelan las relaciones genealógicas de los individuos.

En poblaciones donde no hay posibilidad de conocer el parentesco, como es el caso de los cultivos, la aplicación de los métodos clásicos es muy limitada (Ritland 1996a, Ritland 2000, Thomas *et al.* 2002). Ritland (1996b) propone la estimación de heredabilidad a partir de una generación usando datos moleculares. Este modelo ha sido empleado por varios autores en diferentes familias de plantas (Klaper *et al.* 2001, Van Kleunen & Ritland 2005, Visscher *et al.* 2008, Gómez & López 2014), sin embargo, se ha reportado que el coeficiente de parentesco propuesto por Ritland (1996a) presenta grandes sesgos (Thomas *et al.* 2002, Csilléry *et al.* 2006, Rodríguez *et al.* 2007). Como respuesta, Lynch & Ritland (1999), Wang (2002), Wang (2007), entre otros autores, han desarrollado estimadores basados en marcadores moleculares para determinar los coeficientes de parentesco. Entre los estimadores de parentesco con menos sesgo se encuentra Triadic IBD de Wang (2007), modelo que ha demostrado conservar la significancia biológica al respetar el intervalo de los valores de parentesco (entre 0 y 1), y ha presentado un buen ajuste con respecto a los valores de parentesco estimados con un pedigrí, siendo varios los estudios que han empleado exitosamente este estimador (King *et al.* 2011, Mattila *et al.* 2012, Gross *et al.* 2017).

Diferentes estudios han empleado los marcadores moleculares microsatélites para estimar el coeficiente de parentesco en diferentes especies de plantas (Sweigart *et al.* 1999, Andrew *et al.* 2005, Bessega *et al.* 2009). Los marcadores microsatélites son ideales para determinar la relación genealógica entre los individuos, dado que son altamente polimórficos (Frankham *et al.* 2002), y han sido efectivos en la discriminación de paternidades (Rodríguez *et al.* 2004, Aranguren *et al.* 2005, Azofeifa 2006). La lectura de los mismos requiere técnicas de electroforesis o secuenciación, sin embargo, otro método más reciente es el de emplear

curvas de disociación de alta resolución, o HRM por sus siglas en inglés (*High resolution melting*), que permiten la identificación de variantes de microsatélites sin necesidad de secuenciación (Simko 2016).

Conocer la heredabilidad en plantas es fundamental para la selección de los rasgos de interés, pues indica el grado en que la variabilidad de dicho rasgo se explica por la variación genética, y de esa manera permite predecir el cambio de la media poblacional a partir de la selección de padres (Visscher *et al.* 2008, Gómez & López 2014). Los modelos clásicos para estimar la heredabilidad han sido empleados en diferentes variedades comerciales de ají (Ben & Paran 2000, Janaki *et al.* 2015, Peñuela *et al.* 2018), sin embargo, estos estudios implican tiempos extensos debido a la necesidad de cultivar varias generaciones para conocer el parentesco. Hasta el momento, no se han reportado estimaciones de heredabilidad empleando marcadores moleculares ni la técnica HRM para especies del género *Capsicum* o de la familia Solanaceae.

Con el objetivo de estimar la heredabilidad de descriptores morfológicos y de interés comercial a partir de una sola generación, en las variedades comerciales de ají Cayena (*C. annuum*), Habanero (*C. chinense*), y Tabasco (*C. frutescens*), se realizaron mediciones fenotípicas y se estimó el parentesco usando microsatélites. La metodología propuesta supone un avance considerable en los planes de mejoramiento de cultivos, ya que reduce el tiempo de ejecución de estudios cuantitativos, además, posibilita la investigación de poblaciones donde las relaciones genealógicas son desconocidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siembra y evaluación fenotípica

Se cultivaron 40 individuos de *Capsicum annuum* (Cayena), 40 de *Capsicum frutescens* (Tabasco) y 40 de *Capsicum chinense* (Habanero). Estas variedades comerciales se diferencian claramente por la forma del fruto. Cayena presenta frutos grandes y alargados; en Tabasco son cónicos y pequeños; y en Habanero globosos y medianos (Figura 3.1). Las parcelas de siembra se ubicaron en el área experimental del Laboratorio de Aguas y Suelos de la Escuela de Ingeniería Agrícola de la Universidad del Valle en Cali-Colombia, 3° 22' 22.23''N, 76° 31' 47.82''W.



Figura 3.1. Diferencias en la forma de los frutos entre las variedades comerciales de ají estudiadas.

Se evaluaron rasgos vegetativos y reproductivos de interés comercial, dentro de los propuestos por *The International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI 1995) y por la Unión Internacional Para La Protección De Las Obtenciones Vegetales (UPOV). Para las tres especies se determinó el crecimiento vegetativo al quinto mes, registrando la altura (Al) en cm y ancho del tallo en la base (An) en cm; se monitoreo el número de días a la primera

flor después de la siembra (Df); y al quinto mes se determinó el número de frutos total por planta (Tf). Se escogieron cinco frutos al azar por planta para mediciones de largo (Lf) en cm, ancho (Af) en cm, peso promedio (Pf) en g y número de semillas (Ns).

Extracción de ADN y genotipificación

Se recolectó tejido foliar joven, el cual se secó con ayuda de sílica gel (Chase & Hills 1991). La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1987) modificado por Stewart (1997). Se trituró 0.3 g de tejido foliar seco y se añadieron 500 µl de solución de homogenización (PVP 40 2%, NaCl 1.42M, Tris HCL 100 mM ajustado a pH 8.5, EDTA 0.5M pH 8.0 y CTAB 2%). Posteriormente, se adicionó 3 µl de β-mercaptoetanol y se incubó por 50 min a 65°C. Finalizado el tiempo, se agregó 500 µl de solución de extracción (cloroformo:isoamílico, 24:1), se mezcló y se realizó centrifugación a 6000 rpm por 5 min. Consecutivamente, se rescató 400 µl del sobrenadante y se mezcló con 800 µl de etanol absoluto frío, y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. Finalmente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado por inversión en una toalla de papel a temperatura ambiente y se diluyó con 500µL de LowTE para su almacenamiento a -20°C. Se evaluó la pureza y la cantidad del ADN empleando el equipo Thermo Scientific™ NanoDrop, obteniéndose ADN adecuado para las evaluaciones posteriores. Se prepararon alícuotas de las muestras a 10 ng/µL, diluyendo el ADN total con LowTE.

Para la estimación del parentesco se usaron seis microsatélites reportados para *C. annuum* por Nagy *et al.* (2007) y dos reportados por Lee *et al.* (2004). Los ciclos de amplificación se estandarizaron modificando los ciclos presentados por Nagy *et al.* (2007) y por Lee *et al.* (2004). Esto se realizó empleando el termociclador T100™ de Biorad y la posterior

verificación de la amplificación en geles de agarosa al 1.2%. Con los ciclos ya estandarizados (Tabla 3.1), se usó el termociclador tiempo real CFX96 Touch™ de Biorad y el kit Precision Melting Supermix de Biorad, para la amplificación y la genotipificación. Para cada reacción se adicionaron 5 µL del kit comercial, 0.7 µM de cada cebador (*forward* y *reverse*), 35 ng de ADN y 0.1 µL de agua destilada y desionizada.

La genotipificación de los individuos se realizó mediante el proceso de HRM. El proceso consistió inicialmente, en una PCR tiempo real con fluoróforos que se activan al intercalarse en la doble hélice del ADN, al finalizar la PCR, los amplicones son desnaturalizados incrementando la temperatura progresivamente en 0.2 °C por cada ciclo de 10 s, desde 60°C hasta 95°C de manera que las características propias de cada secuencia, como el tamaño o la composición, ocasionan diferencias en el tiempo de dicha desnaturalización, de esa manera los fluoróforos son liberados diferencialmente dependiendo de la secuencia. Posteriormente, la diferencia en el cambio de fluorescencia entre las muestras se registra por medio del programa Precision Melt Analysis™ v1.2 y a partir del mismo se forman grupos de perfiles genéticos, siendo cada grupo un alelo diferente (Simko 2016) (Figura 3.2). Finalmente, se identificaron los estados alélicos de cada individuo, empleando los puntos de inflexión de las curvas de fluorescencia.

Tabla 3.1. Temperatura de hibridación y número de ciclos usados en la amplificación de los sistemas microsatélites.

SSR	Temperatura de hibridación (°C)	Ciclos	Temperatura de hibridación (°C)	Ciclos
Ng6	55	40		
Ng7	55	40		
Ng8	60	40		
Ng10	60	40		
Ng18	65 ^a	5	60	30
Ng 20	60	40		
Bd3	58.1	40		
Bd12	65 ^a	5	60	30

^a ciclos en cascada para disminuir la amplificación de productos no específicos a -1°C en cada ciclo.

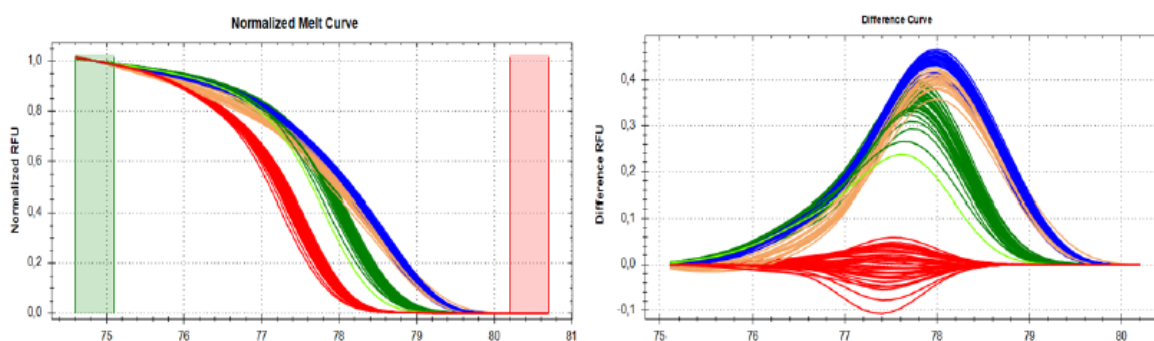


Figura 3.2. Curvas de disociación del ADN obtenidas a partir de la técnica HRM. A la izquierda, temperatura Vs unidades relativas de fluorescencia (RFU) normalizadas y a la derecha, diferenciación respecto a la curva más común. Cada curva indica una muestra, y cada color indica un tipo de secuencia diferente.

Estimación de la heredabilidad

La heredabilidad basada en marcadores moleculares se estimó a partir de una regresión de la similitud fenotípica Z y el parentesco r , propuesta por Ritland (1996b), la cual se expresa en la ecuación [3]. Ritland (1996b) propone, además, una corrección a la varianza del parentesco llamada varianza actual V_R , la cual depende de la estimación del parentesco r por cada marcador molecular. Según Kumar (2005) cuando no es posible determinar el valor de parentesco por cada marcador, debe emplearse la varianza del parentesco V_r ya que no es posible estimar la varianza real.

$$h^2 = \frac{C_{Zr}}{2V_R} [3]$$

El coeficiente $1/2$ presente en la ecuación [3] se relaciona con la asunción de no endogamia F en la población. En poblaciones donde la autogamia es frecuente, se hace necesario determinar F en términos de la heterocigosidad observada promedio $\overline{H_o}$ y la heterocigosidad esperada promedio $\overline{H_e}$ (Ecuación [4]). Con el propósito de introducir el factor endogamia F se empleó el coeficiente de efectos genéticos aditivos de Becker (1984) para estimaciones de heredabilidad. La heredabilidad empleada en el presente estudio (Ecuación [5]) relacionó el corrector de Becker (1984), la regresión de Ritland (1996b) y la varianza del parentesco de Kumar (2005).

$$F = 1 - \frac{\overline{H_o}}{\overline{H_e}} [4]$$

$$h^2 = \frac{1+F}{2} \frac{C_{Zr}}{V_r} [5]$$

Con el objetivo de conocer la sensibilidad del método propuesto para estimar la heredabilidad, se evaluó en conjunto las tres variedades comerciales con sus registros fenotípicos y moleculares, de esta manera se esperaba que la heredabilidad fuese máxima, dado que existe una fuerte diferenciación entre los valores fenotípicos y las relaciones de parentesco entre las tres variedades comerciales. Dado lo extenso de los cálculos matemáticos para estimar la h^2 , fue necesario desarrollar comandos en el programa RStudio(Anexo 6). La estimación del parentesco para cada variedad comercial se realizó por medio del estimador Triadic IBD de Wang (2007) en el programa Coancestry 1.0.1.8 2011.

RESULTADOS

La heterocigosis observada para las tres variedades comerciales de *Capsicum* de acuerdo a los ocho microsatélites evaluados, fue de cero, por tanto, la endogamia encontrada para todos los casos obtuvo un valor de uno. En la Tabla 3.2 se presentan las frecuencias alélicas encontradas para cada microsatélite. Para Tabasco, Ng 6, Ng8 y Ng20 fueron monomórficos, para Habanero solo Ng6 fue monomórfico y para Cayena solo Ng8.

Las frecuencias de los valores de parentesco para las tres variedades comerciales se presentan en la Figura 3.3. En Tabasco, Habanero y Cayena predominaron parejas de individuos sin ningún parentesco genético ($r=0$), distintas proporciones de parejas con algún grado de parentesco y con total parentesco genético ($r=1$). Entre el 91% y 92% de los pares de individuos presentaron soportes *bootstrap* de 1.

Los valores de heredabilidad evaluados independientemente para las variedades comerciales Tabasco, Habanero y Cayena fueron cercanos a cero para todos los rasgos estudiados (Tabla 3.3). De manera contrastante, las heredabilidades de los rasgos para el conjunto de datos de las tres variedades comerciales, fueron mayores a 1.0.

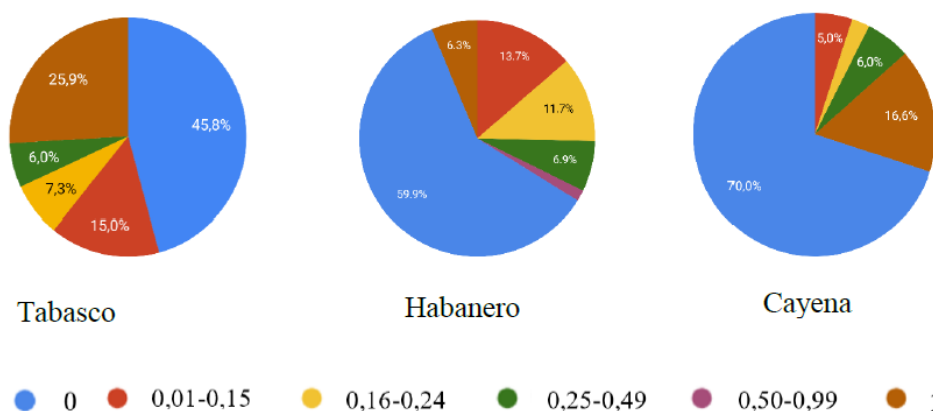


Figura 3.3. Distribución de valores de parentesco (r) estimados con el modelo Triadic IBD de Wang (2007) para las variedades comerciales de ají estudiadas.

Tabla 3.2. Frecuencias alélicas para ocho microsatélites en Tabasco, Habanero y Cayena.

Variedad	Alelo	Ng6	Ng7	Ng8	Ng10	Ng18	Ng20	Bd3	Bd12
Tabasco	1	0.257	0.868	1.000	1.000	0.974	1.00		0.658
	2							0.974	0.211
	3	0.743	0.132						0.132
	4								
	5					0.026			
	6							0.026	
Habanero	1	1.000		0.972			0.972		0.676
	2				0.676	0.971			0.265
	3		0.969	0.028	0.235		0.028	0.829	0.059
	4				0.059			0.171	
	5		0.031		0.429				
	6					0.029			
Cayena	1						0.976	0.976	
	2	0.927	0.795	1.000	1.00		0.024		1.000
	3					0.659			
	4	0.049	0.205			0.341			
	5	0.024						0.024	

Tabla 3.3. Heredabilidad para los rasgos Ancho del tallo (An), Alto del Tallo (Al), Días a la floración (Df), Total de frutos (Tf), Peso promedio de frutos (Pf), Ancho promedio de frutos (Af), Largo promedio de frutos (Lf) y Número de semillas (Ns), en las tres variedades comerciales de *Capsicum*.

	Tabasco		Habanero		Cayena		*Conjunto	
	Media $\pm$ D. E	h^2	Media $\pm$ D. E	h^2	Media $\pm$ D. E	h^2	Media $\pm$ D. E	h^2
An	2.62 $\pm$ 0.80	0.17	1.53 $\pm$ 0.34	0.00	1.48 $\pm$ 0.26	-0.03	1.78 $\pm$ 0.76	0.94
Al	103.97 $\pm$ 24.20	0.05	52.83 $\pm$ 12.60	0.00	77.26 $\pm$ 17.37	0.08	77.26 $\pm$ 1.37	0.82
Df	55.59 $\pm$ 4.80	-0.02	62.63 $\pm$ 11.51	-0.19	45.97 $\pm$ 5.30	0.02	54.49 $\pm$ 10.53	0.95
Tf	535.45 $\pm$ 2.97	-0.05	3.38 $\pm$ 6.00	0.17	11.32 $\pm$ 4.70	-0.06	186.24 $\pm$ 305.85	1.00
Pf	0.98 $\pm$ 0.14	0.01	8.25 $\pm$ 3.20	0.07	44.08 $\pm$ 10.00	0.04	20.70 $\pm$ 21.20	1.12
Af	0.86 $\pm$ 0.05	-0.05	2.60 $\pm$ 0.36	0.12	2.95 $\pm$ 0.30	-0.06	2.11 $\pm$ 0.99	1.14
Lf	3.06 $\pm$ 0.20	0.03	3.69 $\pm$ 0.60	0.00	22.76 $\pm$ 2.69	-0.03	11.49 $\pm$ 9.77	0.91
Ns	32.92 $\pm$ 5.14	0.04	51.23 $\pm$ 21.90	-0.23	146.88 $\pm$ 29	-0.02	78.73 $\pm$ 57.37	0.88

*Conjunto de datos fenotípicos y genotípicos de las tres variedades comerciales

DISCUSIÓN

La heterocigosidad observada de cero en todos los individuos refleja el alto grado de autogamia del género, siendo la autopolinización su principal sistema de fecundación (Pickersgill 1997). Esto se atribuye directamente a la temprana madurez reproductiva dentro el botón floral (Odland & Porter 1941, Munting 1974, Onus & Pickersgill 2004). Resultados similares fueron reportados por Zhang *et al.* (2016), quienes registraron valores de 0.1 para la heterocigosidad en varias especies de *Capsicum* empleando 28 microsatélites. Otro estudio con mayor número de marcadores fue realizado por Lee *et al.* (2016) donde se presentaron valores de heterocigosidad de hasta 0.2 empleando SNP, concordando con la baja heterocigosidad en marcadores SNP reportada en el (Capítulo I). Esto demuestra que, a pesar de incrementar el número de marcadores, la baja heterocigosidad en *Capsicum* no es atípica. Adicionalmente, la ausencia de individuos heterocigotos también puede relacionarse con un fuerte proceso de endogamia asociado con la selección artificial a la que usualmente son sometidas estas variedades comerciales (Sahagún 2006, Castro 2007).

Este es el primer estudio en determinar la heredabilidad de rasgos vegetativos y reproductivos de las variedades comerciales Tabasco, Cayena y Habanero empleando marcadores moleculares. Las heredabilidades cercanas a cero reportadas para todos los rasgos evaluados, indican una poca influencia aditiva en la varianza fenotípica total, es decir que el efecto genético aditivo de los padres en estas variedades evaluadas, influencia poco el valor fenotípico de la progenie. Como se mencionó previamente, en poblaciones agrícolas se suelen presentar valores altos de endogamia (Contreras *et al.* 2011), eso sumado con el efecto de erosión genética causada por la selección direccional y la deriva, explican los valores bajos de heredabilidad aquí reportados. Estudios en el género

Capsicum como los de Manju & Sreelathakumary (2006), Usman *et al.* (2014) y Meena *et al.* (2016) estiman valores altos de heredabilidad para estos mismos rasgos, sin embargo, es necesario comprender que la heredabilidad es un parámetro poblacional, pues depende de las frecuencias alélicas que afectan directamente los valores de la varianza genética (Falconer & Mackay 1996). Esta consideración es de suma importancia, pues justifica el hecho de que la heredabilidad refleja la historia de los individuos en cuestión.

Las heredabilidades cercanas a cero para Tabasco, Cayena y Habanero (Tabla 3.3), indican que la proporción de la varianza aditiva V_A con respecto a la V_P es muy baja, lo que sugiere, que la varianza fenotípica V_P está siendo explicada por los demás componentes (Ecuación [1]). La ausencia de heterocigotos implica descartar el componente de dominancia V_D en la varianza genética V_G , e igualmente es posible despreciar la interacción epistática V_I , pues suele tener valores muy pequeños (Simmons & Crow 1977, Barker 1979, Crow 1987). Por tanto es posible concluir que el componente ambiental es el que afecta enteramente los rasgos estudiados. Es probable que las variedades estudiadas, hayan alcanzado el máximo de respuesta genética y no sean susceptibles para continuar programas de mejoramiento.

Para la misma variedad comercial de Tabasco objeto de este estudio, se estimó la heredabilidad en sentido estricto por medio del diseño clásico de regresión padres-hijos con más de 200 familias (Capítulo II). En donde fue necesario el cultivo de una generación parental y el posterior cultivo de la progenie, dando como resultado valores de heredabilidad cercanos a cero para todos los rasgos. Los resultados similares obtenidos con las dos metodologías, valida el uso de marcadores moleculares para estimar la heredabilidad, pues en ambos estudios se obtuvieron conclusiones semejantes.

Las heredabilidades altas para el conjunto de las tres variedades comerciales (Tabla 3.3), demuestra la sensibilidad del modelo para contrastar la varianza fenotípica con la genética, indicando una alta correlación entre los valores fenotípicos y el grado de parentesco. Esta correlación se presenta gracias a la fuerte diferenciación entre las tres variedades comerciales estudiadas. Los resultados presentados para este análisis coinciden con los presentados en estudios clásicos de heredabilidad en los cuales se evalúan grupos de individuos fuertemente diferenciados genéticamente, como los de Sreelathakumary & Rajamony (2004), Siddique *et al.* (2006) y Pandit & Adhikary (2014).

Empleando los valores de parentesco fue posible agrupar los individuos en términos de relaciones familiares. Se logró distinguir coeficientes de parentesco entre individuos similares a los de padre-hijo o hermanos completos con los valores $r \approx 0.5$; y también distinguir los individuos no emparentados, cuando los valores fueron de $r \approx 0$. Esto puede ser relevante en poblaciones silvestres donde no es posible llevar registro genealógico ni observar los patrones de reproducción, como se evidencia en los estudios de Conson *et al.* (2013) y Lobo *et al.* (2013), quienes emplean el estimador de parentesco Triadic IBD para conocer el parentesco en diferentes especies de Malvaceas. La metodología aquí empleada se presenta como una alternativa para deducir patrones de parentesco empleando muestreo y genotipificación, lo que además puede ser utilizado en la formulación de hipótesis evolutivas respecto a la reproducción y estimaciones de endogamia (Dewoody 2005).

La estimación de parentesco a partir de una generación representa un avance en la mejora de plantas y animales, pues contrasta con los estudios clásicos que requieren del seguimiento generacional. La determinación del parentesco a partir del estimador Triadic IBD, ha proporcionado ayuda a los mejoradores para identificar el grado de endogamia en

poblaciones reproductoras (Onoue *et al.* 2015) y ha sido empleado para analizar la estructura poblacional en relación con la adaptación genética de plantas agrícolas (Skink *et al.* 2017).

A pesar de que el direccionamiento de los rasgos evaluados para las variedades comerciales estudiadas no es recomendable a causa de la fuerte influencia ambiental, esta misma influencia favorece la evaluación de estudios agrícolas en términos de interacción genotipo-ambiente. La metodología aquí presentada puede ser aplicada a distintos tipos de cultivos, y supone una reducción en tiempo y costos de los estudios previos al mejoramiento o de cualquier estudio relacionado con la determinación de los componentes de la varianza fenotípica. Esta metodología también puede ser útil en poblaciones naturales pues permite reducir tiempos de registro de datos generacionales. Un enfoque poblacional y cuantitativo resultaría ahora adecuado para características de importancia ecológica en especies de ciclos de vida largos, o en los que la reproducción no pueda ser controlada.

El principal aporte de esta investigación a las estimaciones de heredabilidad es el procedimiento para su cálculo, pues usa parentescos insesgados vinculando a su vez una corrección para poblaciones con endogamia. En este documento se comparten los comandos en R que permiten desarrollar de una manera más rápida los extensos cálculos matemáticos necesarios para la estimación de la heredabilidad mediante esta metodología.

REFERENCIAS

- Andrew, R. L., Peakall, R., Wallis, I. R., Wood, J. T., Knight, E. J. and Foley, W. J. (2005), "Marker-based quantitative genetics in the wild?: The heritability and genetic correlation of chemical defenses in *Eucalyptus*", *Genetics*, Vol. 171 No. 4, pp. 1989-1998.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y. and Jordana, J. (2005), "Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión", *Latinoam. Prod. Anim*, Vol. 13 No. 1, pp. 30-42.
- Arilla, J. P. (1998), *Notas sobre teoría de mejora genética*, Vol. 49, Univ. Autónoma de Barcelona, Barcelona. 15
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006), "Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico", *Agronomía mesoamericana*, Vol. 17 No. 2, pp. 221-242.
- Barker, J. S. F. (1979), Inter-locus interactions: a review experimental evidence. *Theoretical population biology*, Vol. 16 No.3, pp. 323-346.
- Barker, J. S. F. (1979), Inter-locus interactions: a review experimental evidence. *Theoretical population biology*, Vol. 16 No.3, pp. 323-346.
- Becker, W A. (1984), *Manual of Quantitative Genetics* 4th edn, Academic Enterprises, Pullman, Washington.
- Bessegga, C., Saidman, B. O., Darquier, M. R., Ewens, M., Sánchez, L., Rozenberg, P. and Vilardi, J. C. (2009), "Consistency between marker-and genealogy-based heritability estimates in an experimental stand of *Prosopis alba* (Leguminosae)", *American journal of botany*, Vol. 96 No. 2, pp. 458-465.
- Ben-Chaim, A. and Paran, I. (2000), "Genetic analysis of quantitative traits in pepper (*Capsicum annuum*)", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol. 125 No.1, pp. 66-70.
- Burton, G. W., & Devane, E. H. (1953). "Estimating heritability in tall fescue (*Festuca arundinacea*) from replicated clonal material 1". *Agronomy Journal*, Vol. 45 No. 10, pp. 478-481.
- Carrizo García, C., Barfuss, M. H., Sehr, E. M., Barboza, G. E., Samuel, R., Moscone, E. A., and Ehrendorfer, F. (2016), "Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae)", *Annals of botany*, Vol. 118 No.1, pp. 35-51.

Cámara, D. C. D. C. (2008), “Un negocio picante”, Revista Acción, 22 de mayo, Disponible en <http://www.ccc.org.co/revista-accion-ccc/un-negocio-picante/> [Consultado 13-11-2017].

Castro Triana, A. M. (2007), *Uso de marcadores microsatélites para evaluar el nivel de heterocigosidad en líneas endogámicas S1 de yuca (Manihot esculenta Crantz)*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.

Chase, M. W. and Hills, H. H. (1991), “Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies”, *Taxon*, pp. 215-220.

Conson, A. R., Ruas, E. A., Vieira, B. G., Rodrigues, L. A., Costa, B. F., Bianchini, E., ... & Ruas, P. M. (2013). “Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae)”. *Genetica*, Vol.141 No.4-6, pp. 205-215.

Contreras Toledo, A. R., López Sánchez, H., Santacruz Varela, A., Valadez Moctezuma, E., Aguilar Rincón, V. H., Corona Torres, T., & López, P. A. (2011). “Diversidad Genética en México de variedades nativas de chile poblano mediante microsatélites”. *Revista fitotecnica mexicana*, Vol. 34 No. 4, pp. 225-232.

Crow, J. F. (1987). “Population genetics history: a personal view”. *Annual review of genetics*, Vol. 21 No.1, pp. 1-22.

Csilléry, K., Johnson, T., Beraldi, D., Clutton-Brock, T. H., Coltman, D., Hansson, B. & Pemberton, J. (2006). “Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates”, *Genetics*, Vol. 173 No. 4, pp. 2091-2101.

DeWoody, J. A. (2005), “Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: practical applications for wild animals”, *The Journal of Wildlife Management*, Vol. 69 No. 4, pp. 1400-1418.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987), “A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue”, *Phytochemical Bulletin*, Vol. 19, pp. 11-15.

Falconer, D. S. and Mackay, F. C. (1996), *Introducción a la Genética Cuantitativa*, Editorial Acribia, S.A, Zaragoza.

Frankham, R., Briscoe, D. A., and Ballou, J. D. (2002), *Introduction to conservation genetics*, Cambridge university press, Cambridge.

Gómez-Lopera, N., and López-Gallego, C. (2014), “Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas en caracteres morfológicos y fisiológicos para una población de *Zamia obliqua* A. Br. (Zamiaceae: Cycadales)”, *Actualidades Biológicas*, Vol. 36 No. 101, pp. 137-148.

Gross, C. L., Fatemi, M., & Simpson, I. H. (2017). "Seed provenance for changing climates: early growth traits of nonlocal seed are better adapted to future climatic scenarios, but not to current field conditions", *Restoration Ecology*, Vol.25 No.4, pp. 577-586.

Harris, D. L. (1964), "Genotypic covariances between inbred relatives", *Genetics*, Vol. 50 No. 6, pp.1319-1348.

Holland, J. B., Nyquist, W. E., and Cervantes-Martínez, C. T. (2003), "Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update", in Janick, J. (Ed.), *Plant breeding reviews*, John Wiley and Sons, New Jersey, pp. 9-112.

Jacquard, A. (1972), "Genetic information given by a relative", *Biometrics*, Vol. 28, pp. 1101-1114.

Janaki, M., Naidu, L. N., Ramana, C. V. and RAO, M. P. (2015), "Assessment of genetic variability, heritability and genetic advance for quantitative traits in chilli (*Capsicum annuum* L.)", *The Bioscan*, Vol. 10 No. 2, pp. 729-733.

Jäger, M., Jiménez, A. and Amaya, K. (2013), "Guía de oportunidades de mercado para los ajíes nativos de Perú", *Biodiversity International*, Roma, Italia.

King, A. J., Clark, F. E. and Cowlishaw, G. (2011), "The dining etiquette of desert baboons: the roles of social bonds, kinship, and dominance in co-feeding networks", *American Journal of Primatology*, Vol. 73 No.8, pp. 768-774.

Klaper, R., Ritland, K., Mousseau, T. A. and Hunter, M. D. (2001), "Heritability of phenolics in *Quercus laevis* inferred using molecular markers", *Journal of Heredity*, Vol. 92 No 5, pp. 421-426.

Kumar, S. and Richardson, T. E. (2005), "Inferring relatedness and heritability using molecular markers in radiata pine", *Molecular Breeding*, Vol. 15 No 1, pp. 55-64.

Lee J. M., Nahm S.H., Kim Y.M., and Kim B.D. (2004), "Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper", *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 108, pp. 619-627.

Lee, H. Y., Ro, N. Y., Jeong, H. J., Kwon, J. K., Jo, J., Ha, Y. and Kang, B. C. (2016), "Genetic diversity and population structure analysis to construct a core collection from a large *Capsicum* germplasm". *BMC genetics*, Vol. 17 No. 1, pp. 17-142.

Lobo, J., Solís, S., Fuchs, E. J., & Quesada, M. (2013). Individual and Temporal Variation in Outcrossing Rates and Pollen Flow Patterns in *Ceiba pentandra* (Malvaceae: Bombacoidea). *Biotropica*, 45(2), 185-194.

Lynch, M. and Ritland, K. (1999), "Estimation of pairwise relatedness with molecular markers", *Genetics*, Vol. 152 No. 4, pp. 1753-1766.

Malecot, G. (1948), *Les Mathematiques de l'heredite*. Masson et Cie, Paris.

Manju, P. R. and Sreelathakumary, I. (2006). “Genetic variability, heritability and genetic advance in hot chilli (*Capsicum chinense* Jacq.)”, *Journal of Tropical Agriculture*, Vol. 40, pp. 4-6.

Mattila, A. L., Duplouy, A., Kirjokangas, M., Lehtonen, R., Rastas, P. and Hanski, I. (2012), “High genetic load in an old isolated butterfly population”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201205789; DOI: 10.1073/pnas.1205789109.

Meena, M. L., Kumar, N., Meena, J. K. and Rai, T. (2016), “Genetic variability, heritability and genetic advances in chilli, *Capsicum annum*”, *Bioscience Biotechnology Research Communications*, Vol. 9 No. 2, pp. 258-262.

Munting, A. J. (1974), “Development of flower and fruit of *Capsicum annum* L”, *Acta botanica neerlandica*, Vol. 23 No 4, pp. 415-432.

Naegele, R. P., Mitchell, J. and Hausbeck, M. K. (2016), “Genetic Diversity, Population Structure, and Heritability of Fruit Traits in *Capsicum annum*”. *PloS one*, Vol. 11 No. 7, pp.e0156969.

Nagy I., Stágel A., Sasvári Z., Röder M. and Ganai M. (2007), “Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annum* L.”, *Genome* Vol. 50, pp. 668–688.

Nascimento, M. F., Finger, F. L., Bruckner, C. H., Silva Neto, J. J., Rêgo, M. M., Nascimento, N. F. F., and Rêgo, E. R. (2012), “Heritability and variability of morphological traits in a segregating generation of ornamental pepper”. In XXIV International Eucarpia Symposium Section Ornamentals: Ornamental Breeding Worldwide 953, pp. 299-304.

Onoue, N., Yamada, M., Yamamoto, T., Terakami, S., Nishitani, C., Kunihiisa, M., and Saito, T. (2015), “Kinship and inbreeding estimates based on microsatellite markers in breeding of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)”, *Euphytica*, Vol. 205 No. 2, pp. 539-555.

Onus, A. N., & Pickersgill, B. 2004, Unilateral incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): occurrence and taxonomic distribution. *Annals of botany*, Vol. 94 No. 2, pp. 289-295.

Odland, M.L. and A.M. Porter. 1941. A study of natural crossing in pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* Vol.38 pp. 585–588.

Pandit, M. K., and Adhikary, S. (2014), “Variability and Heritability Estimates in Some Reproductive Characters and Yield in Chilli (*Capsicum annum* L.)”, *International Journal of Plant and Soil Science*, Vol. 3 No. 7, pp. 845-853.

Peñuela, M., Viáfara, R., López, J., Cifuentes, H., Arias, L., Reina, S., and Cárdenas, H. (2018), “Heredabilidad de caracteres vegetativos y asociados a la producción en ají Tabasco (*Capsium frutescens*: Solanaceae)”, in: XII Congreso Latinoamericano de Botánica 2018, Quito-Ecuador, 21-27 octubre, pp.673.

Pickersgill, B. (1983), “Dispersal and distribution in crop plants”. *Naturwiss ver Hamburg*, Vol. 7, pp. 285-301. Pickersgill, B. (1997), “Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp”, *Euphytica*, Vol. 96 No. 1, pp. 129-133.

Pistorale, S. M., Abbott, L. A., & Andrés, A. (2008). Diversidad genética y heredabilidad en sentido amplio en agropiro alargado, *Thinopyrum ponticum*. Ciencia e investigación agraria, 35(3), 259-264.

Restrepo Salazar, J. C. (2011), “Cadena agroalimentaria de las hortalizas: Indicadores y acciones”, Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Hortalizas/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/002%20-%20Cifras%20Sectoriales%20-%202011%20Marzo.pdf> [Consultado 13-11-2017]

Ritland, K. (1996a), “Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients”, *Genetics Research*, Vol. 67 No. 2, pp. 175-185.

Ritland, K. (1996b), “A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations”, *Evolution*, Vol. 50 No. 3, pp. 1062-1073.

Ritland, K. (2000), “Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature”, *Molecular Ecology*, Vol. 9 No.9, pp. 1195-1204.

Rodríguez, B., Wheeler, J. C., Dodd, C. S., Bruford, M. W. and Rosadio, A. (2004), “Determinación de parentesco en alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN microsatélite”, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, Vol. 15 No. 2, pp. 113-119.

Rodríguez-Ramilo, S. T., Toro, M. A., Caballero, A. and Fernández, J. (2007), “The accuracy of a heritability estimator using molecular information”, *Conservation genetics*, Vol. 8 No. 5, pp. 1189-1198.

Sahagún-Castellanos, J. (2006), “El coeficiente de endogamia de una población finita autoestéril”, *Revista Chapingo serie Horticultura*, Vol. 12 No. 1, pp. 66-68.

Seguí, E. and Machado, H. (1992), “Estimación de la heredabilidad en hierba de guinea (*Panicum maximum* Jacq.)”, *Pastos y Forrajes*, Vol.15 No.3, pp. 191-196.

Siddique, M., Malik, M. F. A. and Awan, S. I. (2006). “Genetic divergence, association and performance evaluation of different genotypes of mungbean (*Vigna radiata*)”, *Int. J. Agric. Biol*, Vol. 8 No. 6, pp. 793-795.

Sikkink, K. L., Kobiela, M. E. and Snell-Rood, E. C. (2017). “Genomic adaptation to agricultural environments: cabbage white butterflies (*Pieris rapae*) as a case study”, *BMC genomics*, Vol. 18 No. 1, pp. 412.

Simmons, M. J., & Crow, J. F. (1977), Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations, *Annual review of genetics*, Vol. 11 No. 1, pp. 49-78.

Simko, I. (2016), “High-resolution DNA melting analysis in plant research”, *Trends in plant science*, Vol 21 No.6, pp. 528-537.

Singh, M., Ceccarelli, S. and Hamblin, J. (1993), “Estimation of heritability from varietal trials data”, *Theoretical and applied genetics*, Vol. 86 No. 4, pp. 437-441.

Sreelathakumary, I. Rajamony, L. (2004), “Variability, heritability and genetic advance in chilli (*Capsicum annuum* L.), *Journal of Tropical Agriculture*, Vol 42, pp. 35-37.

Stewart, C. N. (1997), “Rapid DNA Extraction from Plants”, In Micheli, M. R., and Bova, R. (Ed), *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 25-29.

Sweigart, A., Karoly, K., Jones, A. and Willis, J. H. (1999), “The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in a population of *Mimulus guttatus*”, *Heredity*, Vol. 83 No. 5, pp. 625-632.

Thomas, S. C., Coltman, D. W. and Pemberton, J. M. (2002), “The use of marker-based relationship information to estimate the heritability of body weight in a natural population: a cautionary tale”, *Journal of Evolutionary Biology*, Vol. 15 No.1, pp. 92-99.

Usman, M. G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Malek, M. A. and Abdul Latif, M. (2014), “Heritability and genetic advance among chili pepper genotypes for heat tolerance and morphophysiological characteristics”, *The Scientific World Journal*, Vol. 2014.

Van Kleunen, M. and Ritland, K. (2005), “Estimating heritabilities and genetic correlations with marker-based methods: an experimental test in *Mimulus guttatus*”. *Journal of Heredity*, Vol. 96 No. 4, pp. 368-375.

Visscher, P. M., Hill, W. G. and Wray, N. R. (2008), “Heritability in the genomics era concepts and misconceptions”, *Nature Reviews Genetics*, Vol. 9 No. 4, pp. 255-266.

Wang, J. (2002), “An estimator for pairwise relatedness using molecular markers”, *Genetics*, Vol. 160 No. 3, pp. 1203-1215.

Wang, J. (2007), “Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness”, *Genetics Research*, Vol. 89 No. 3, pp. 135-153.

Warner, J. N. (1952), “A Method for Estimating Heritability 1”, *Agronomy journal*, Vol. 44 No.8,pp.427-430.

Zhang, X., Zhang, Z., Gu, X., Mao, S., Li, X., Chadoeuf, J., Palloix, A., Wang, L. and Zhang, B. (2016), “Genetic diversity of pepper (*Capsicum* spp.) germplasm resources in China reflects selection for cultivar types and spatial distribution”, *Journal of Integrative Agriculture*, Vol. 15 No. 9, pp. 1991-2001.

DISCUSIÓN GENERAL

La descripción morfológica de las variedades comerciales deají Tabasco, Cayena y Habanero, se realizó en detalle y permitió comprender cuál es el comportamiento fenotípico de cada cultivo en particular (Tablas 1.3 y 1.4). Las plantas de Tabasco evaluadas, son por lo general erectas y de un rápido crecimiento vegetativo, presentan un gran número de frutos, de alrededor de tres centímetros de largo y uno de diámetro, con un peso aproximado de un gramo. Esta variedad comercial en particular, se caracteriza por poseer plantas con muchos frutos y de elevada pungencia. Las plantas de Cayena evaluadas, precisan de tutores para su crecimiento debido a que los tallos no sostienen por si solos el peso de los frutos, tienen un rápido crecimiento vegetativo, e inician su floración muy tempranamente. Sus frutos son de alrededor de 22 centímetros de largo y tres de ancho, presentando un gran número de semillas, tienen aproximadamente 40 gramos de peso y en general poseen una baja pungencia. Mientras que las plantas de Habanero evaluadas, presentan un crecimiento vegetativo lento, acompañado de un inicio tardío de la floración, un número variable de frutos de apariencia globosa de alrededor de tres centímetros de largo y ancho, y con alrededor de ocho 8 gramos de peso, siendo esta la variedad más pungente de todas.

Esta descripción morfológica detallada de los rasgos, permitió conocer diversos parámetros estadísticos que pueden ser de gran utilidad para agricultores y mejoradores que pretendan trabajar con las variedades comerciales evaluadas. A su vez, la comparación morfológica entre Tabasco, Cayena y Habanero, evidenció el grado de correlación entre los rasgos en un

grupo de especies cercanamente emparentadas. Lo que permitió hipotetizar cuáles de ellos se encuentran asociados en el desarrollo y pudieran tener una respuesta similar a selección.

La caracterización molecular de las variedades comerciales realizada con marcadores microsatélites, mostraron en general una considerable diversidad genética para cada variedad en términos de número de perfiles genéticos. Sin embargo, para ninguno de los sistemas evaluados se encontraron individuos heterocigotos, un resultado esperado debido al alto grado de autofecundación de las plantas del género *Capsicum* reportado previamente en otros estudios (Lee *et al.* 2016, Taranto *et al.* 2016). Este resultado evidencia el alto grado de homocigosis de las plantas evaluadas y brinda confianza a los eventos de multiplicación de semillas realizados por la empresa Hugo Restrepo y Cía que tenían la intención evitar la polinización cruzada. Además, la técnica de visualización de microsatélites a través de análisis de alta resolución de fusión (HRM), resultó ser muy efectiva en la discriminación de los diferentes alelos en todos los sistemas, por lo que se recomienda su uso extendido en futuros estudios y en especies de plantas relacionadas.

Los marcadores SNP obtenidos a partir de las lecturas de secuenciación Illumina y su respectivo ensamblaje al más reciente genoma de referencia de *C. annuum*, permitió extraer un elevado número de variantes que mostraron resultados similares a los obtenidos con marcadores microsatélites. Evidenciando una baja heterocigosidad observada en los *loci* y proporciones equivalentes de los componentes de varianza molecular para las tres variedades comerciales evaluadas en conjunto, donde fue evidente que el componente entre variedades presentó la mayor proporción, algo que se vio reflejado en los valores de distanciamiento genético de F_{ST} y los análisis de estructura con técnicas multivariadas para ambos tipos de marcadores (Tablas 1.7, 1.8 y 1.9).

Para conocer los valores de heredabilidad de los rasgos medidos, se implementó un diseño experimental de regresión progenitor-progenie en la variedad comercial Tabasco, la cual sirvió como modelo de estudio. Este diseño constó de la valoración fenotípica de los rasgos a un elevado número de plantas parentales y la posterior valoración de sus plantas hijas, y consistió básicamente en la determinación del coeficiente de regresión con un buen grado de precisión, razón por la cual se utilizó un amplio número de familias. En este diseño, la heredabilidad se extrajo del coeficiente de regresión, puesto que este explica en qué proporción los valores fenotípicos de los hijos son explicados por los valores fenotípicos de los padres, en otras palabras, muestra cual es la proporción del rasgo que es explicada por el componente hereditario.

Debido a que se trabajó con plantas altamente autóгамas, se tuvo especial cuidado en la determinación de los coeficientes de la varianza aditiva con los cuales se realizaron los cálculos de la heredabilidad. Esto debido, a la necesidad de ajustar los modelos que usualmente son planteados con las asunciones de apareamiento aleatorio, a las condiciones particulares de los cultivos de ají, donde lo más usual es la autopolinización. Para esto, los marcadores microsatélites fueron de extrema importancia debido a que permitieron la estimación de la endogamia del cultivo, a través de la cuantificación de la heterocigosidad observada y esperada, siendo la endogamia en todos los casos igual a uno, indicando precisamente que no existe apareamiento aleatorio dentro de los conjuntos de individuos evaluados. El coeficiente de la varianza aditiva propuesto por Becker (1984), dio como resultado el valor de uno para todas las estimaciones, por lo que el cálculo de heredabilidad en sentido estricto para la variedad comercial Tabasco, fue igual al coeficiente de regresión estimado. Algo, que también ocurrió en las heredabilidades calculadas a partir de la

correlación entre la similitud fenotípica y el parentesco de los individuos estimado con microsatélites para Tabasco, Cayena y Habanero.

Los valores de heredabilidad cercanos a cero obtenidos para Tabasco a través de la regresión progenitor-progenie, muestran que los rasgos fenotípicos estudiados presentaron una baja proporción de varianza aditiva respecto a la varianza fenotípica, por lo que el principal factor que influye en las varianzas observadas en los rasgos medidos es el ambiental. Este resultado es de gran importancia, porque advierte que la heredabilidad de los rasgos es muy baja en la variedad comercial de ají Tabasco estudiada, y sugiere que en el caso de realizarse selección direccional para estos rasgos, no se observará respuesta. Una observación detallada de los gráficos de dispersión elaborados para todos los rasgos (Figuras 2.1-2.3), muestran una general ausencia de tendencia de los datos, exponiendo que parentales con valores fenotípicos altos tienen descendencia con valores fenotípicos bajos y viceversa. Por lo que se confirma de manera gráfica que a nivel de la variedad comercial de Tabasco estudiada, la selección de parentales para un posible proceso de direccionamiento genético no generará un cambio en la próxima generación sobre la media de ninguno de los rasgos.

Debe recordarse que la heredabilidad es un parámetro dependiente de las frecuencias alélicas de los *loci* que afectan a los rasgos, es por tanto, que podría inferirse que los *loci* responsables de estos rasgos en la variedad comercial de Tabasco estudiada hayan alcanzado una posible fijación de sus frecuencias. Esto es soportado por la fijación de los alelos en los sistemas microsatélites evaluados en Tabasco, sugiriendo que también ha ocurrido lo mismo en los *loci* que configuran los rasgos de interés. Estos valores bajos de heredabilidad son muy probablemente producto de la intensa selección direccional a la que

ha sido sometido este material vegetal, sumado a los muy probables efectos de deriva en la escogencia de semillas y a la autopolinización recurrente en estas especies de plantas.

Por lo que se puede concluir que esta variedad comercial de ají Tabasco, presenta valores de heredabilidad cercanos a cero. Así pues, las diferencias en sus rasgos vegetativos y productivos son en gran proporción resultado de los efectos ambientales particulares donde los individuos se desarrollan. No es recomendable comenzar procesos de selección en esta variedad comercial, pero puede ser utilizada para evaluar su respuesta fenotípica a diferentes condiciones ambientales con el objetivo de conocer cuáles de ellas favorecen la expresión de los rasgos de interés.

La heredabilidad estimada a través de métodos clásicos como los de regresión progenitor-progenie es analíticamente sencilla de obtener, sin embargo, es metodológicamente exigente, puesto que se precisa desarrollar el cultivo de los parentales y el posterior cultivo de los descendientes. Lo que sumado a que se requiere un gran número de familias para obtener estimaciones precisas, hace que se eleven los costos de las estimaciones y el tiempo requerido para desarrollarlas. Es por esta razón, que son escasas las estimaciones de heredabilidad en muchos programas de direccionamiento genético, por lo que usualmente se realizan sin conocer este parámetro. En esta investigación se propuso estimar la heredabilidad de los rasgos a partir de las similitudes fenotípicas y el parentesco entre individuos estimado con marcadores moleculares, con la intención de precisamente reducir los tiempos y el número de individuos necesarios para la obtención del parámetro.

El método de estimación de heredabilidad con la implementación de marcadores moleculares, busca en esencia conocer la correlación entre las diferencias morfológicas del

rasgo y el parentesco genético entre individuos. Esta metodología fue en un inicio propuesta por Ritland (1996), pero fue poco utilizada puesto que su estimador de parentesco propio presentaba grandes sesgos para continuar con el cálculo de la heredabilidad, lo que impidió su uso extendido. Por suerte, numerosos estimadores de parentesco fueron propuestos posteriormente, y fue precisamente el estimador de parentesco Triadic IBD de Wang (2007), el que demostró ser el menos insesgado y el único que respetó los intervalos de parentesco entre 0 y 1. Al encontrarse un mejor estimador de parentesco, la aplicación del método propuesto por Ritland para estimar la heredabilidad pudo ser ahora más acertada y puede realizarse para un número bajo de individuos y en tan solo una generación.

Para validar si esta metodología brindaba resultados confiables de heredabilidad, se compararon sus resultados para Tabasco, con los obtenidos para esta misma variedad con la regresión progenitor-progenie. Siendo los resultados obtenidos por ambas metodologías muy similares entre sí, indicando que la estimación de la heredabilidad con la ayuda de marcadores moleculares puede ser considerada como una alternativa confiable para estudios donde el número de individuos sea reducido y se desee acortar el tiempo de estimación. Las estimaciones de heredabilidad con el uso de marcadores moleculares también arrojó valores cercanos a cero para todos los rasgos evaluados en las variedades comerciales de Tabasco, Cayena y Habanero, evidenciando que presentan escasa variabilidad aditiva en proporción con su variabilidad fenotípica y que esta última es en gran medida producto de los efectos ambientales que actúan sobre el desarrollo de los individuos, al igual que lo que se reportó para la variedad comercial de Tabasco con la regresión progenitor-progenie.

Continuando con el proceso de validación de esta metodología, se propuso además realizar una estimación conjunta de heredabilidad para todos los rasgos en las tres variedades. Esto con el objetivo de conocer si efectivamente el método describía acertadamente este parámetro, puesto que se esperaba que las heredabilidades fueran altas si se combinaban individuos con rasgos morfológicos extremos y un reducido parentesco genético. Lo que dio como resultado en efecto, heredabilidades altas para los rasgos de las tres variedades comerciales evaluadas en conjunto, confirmando que el método es sensible y que las estimaciones de heredabilidad estimadas por separado son acertadas.

Al igual que para la estimación de la endogamia, los marcadores microsatélites demostraron ser efectivos para la estimación del parentesco con el modelo Triadic IBD. Cabe resaltar que en esta metodología de estimación de la heredabilidad con marcadores moleculares fue muy importante introducir el coeficiente de los valores aditivos de Becker (1984), para obtener un ajuste adecuado, puesto que el planteamiento inicial de Ritland estuvo dirigido para individuos no emparentados, algo totalmente contrario a lo que se evidenció para las variedades de ají en este estudio. Debe prestarse especial atención en la utilización de este coeficiente, puesto que modifica el número dos del denominador de la fórmula de Ritland en concordancia a la endogamia encontrada en el conjunto de individuos estudiados, por lo que en estimaciones con máxima endogamia como la reportadas en este estudio, los valores máximos de heredabilidad nunca pasarían de 0,5 si no se realizara este ajuste. En este documento se comparten los scripts en R que desarrollan extensos procedimientos matemáticos para el cálculo de la heredabilidad estimada con el parentesco usando marcadores moleculares, a la espera de que puedan ser de utilidad en próximos estudios.

Se propone que esta metodología junto con los respectivos ajustes al organismo de estudio, pueda ser utilizada extensamente en cultivos de diversos tipos con el objetivo de conocer los valores de heredabilidad. Debido a que arroja resultados similares a los obtenidos con los métodos tradicionales, puede estimarse para un número reducido de individuos, permitiendo la disminución en los tiempos y posiblemente en los costos. Se espera que próximamente las estimaciones de parentesco puedan realizarse de manera accesible con marcadores SNP gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y la disminución en sus costos, permitiendo que este tipo de marcadores sean utilizados ampliamente para la aplicación de la metodología aquí propuesta.

Finalmente, la presente investigación doctoral proporcionó un avance en el conocimiento de la variabilidad fenotípica y genotípica de las variedades comerciales de ají Tabasco, Cayena y Habanero ampliamente cultivadas en el Valle del Cauca y brindó una estimación confiable de la heredabilidad de sus rasgos, para que sean tenidas en cuenta por los agricultores y mejoradores que pretendan realizar uso de este material vegetal. A su vez, se desarrolló una metodología novedosa para la estimación de la heredabilidad que cuenta con un amplio potencial para su aplicación en la agricultura, y que puede ser de gran utilidad para disminuir los tiempos y costos asociados a las estimaciones tradicionales de heredabilidad, lo que puede incrementar notablemente los avances en programas de mejoramiento genético en distintas especies.

REFERENCIAS GENERAL

Becker, W A. (1984). Manual of Quantitative Genetics 4th edn, Academic Enterprises, Pullman, Washington.

Falconer DS, Mackay FC. 1996. Introducción a la Genética Cuantitativa. Zaragoza: 17 Editorial Acribia, S.A.

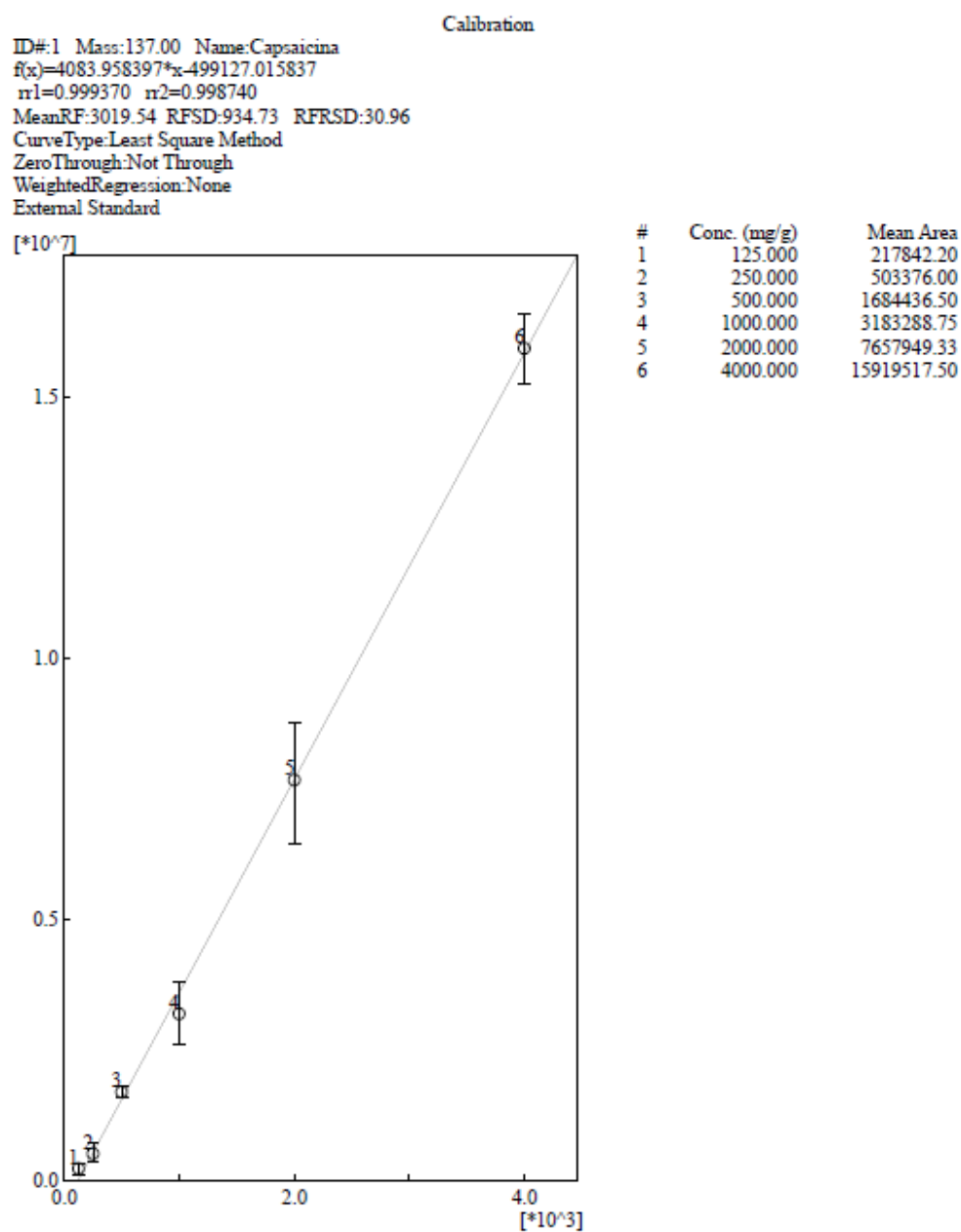
Lee, H-Y. Ro, N-Y. Jeong, H-J. Kwon, J-K. Jo, J. Ha, Y. Jung, A. Han, J. Venkatesh, J. Kang, B-C. 2016. Genetic diversity and population structure analysis to construct a core collection from a large *Capsicum* germoplasm. BMC Genetics (17): 142.

Ritland, K. (1996), “A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations”, Evolution, Vol. 50 No. 3, pp. 1062-1073.

Taranto, F. D’Agostino, N. Greco, B. Cardi, T. Tripodi, P. 2016. Genome-wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing. BMC Genomics 17:943.

Wang, J. (2007), “Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness”, Genetics Research, Vol. 89 No. 3, pp. 135-153.

ANEXOS



Anexo 1. Curva de calibración de capsaicina usando metanol como solvente en GCMS.

Method

[Comment]

===== Analytical Line 1 =====

[AOC-20i+s]

of Rinses with Presolvent :5
 # of Rinses with Solvent(post) :5
 # of Rinses with Sample :5
 Plunger Speed(Suction) :High
 Viscosity Comp. Time :0.2 sec
 Plunger Speed(Injection) :High
 Syringe Insertion Speed :High
 Injection Mode :Normal
 Pumping Times :5
 Inj. Port Dwell Time :5.0 sec
 Terminal Air Gap :No
 Plunger Washing Speed :High
 Washing Volume :8uL
 Syringe Suction Position :0.0 mm
 Syringe Injection Position :0.0 mm
 Solvent Selection :All A,B,C

[GC-2010]

Column Oven Temp. :200.0 °C
 Injection Temp. :300.00 °C
 Injection Mode :Split
 Flow Control Mode :Linear Velocity
 Pressure :324.0 kPa
 Total Flow :15.0 mL/min
 Column Flow :2.00 mL/min
 Linear Velocity :38.7 cm/sec
 Purge Flow :3.0 mL/min
 Split Ratio :5.0
 High Pressure Injection :OFF
 Carrier Gas Saver :ON
 Carrier Gas Saver Split Ratio :4.0
 Carrier Gas Saver Time :1.50 min
 Splitter Hold :OFF
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	200.0	2.00
30.00	280.0	0.00
10.00	310.0	5.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes

< Ready Check APC Flow >

< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait :No
 Equilibrium Time :1.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]

Micro Scan Width :0.00 amu
 IonSourceTemp :230.00 °C
 Interface Temp :280.00 °C
 Solvent Cut Time :4.50 min
 Detector Gain Mode :Relative to the Tuning Result
 Detector Gain :1.25 kV +0.30 kV
 Threshold :1000

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :5.00min
 End Time :12.00min
 ACQ Mode :Scan
 Event Time :0.20sec
 Scan Speed :2000
 Start m/z :35.00
 End m/z :400.00

--Group 1 - Event 2--

Start Time :5.00min
 End Time :12.00min
 ACQ Mode :SIM
 Event Time :0.10sec
 Ch1-m/z :137.00
 Ch2-m/z :305.00
 Ch3-m/z :307.00

Sample Inlet Unit

:GC

[MS Program]

Use MS Program :OFF

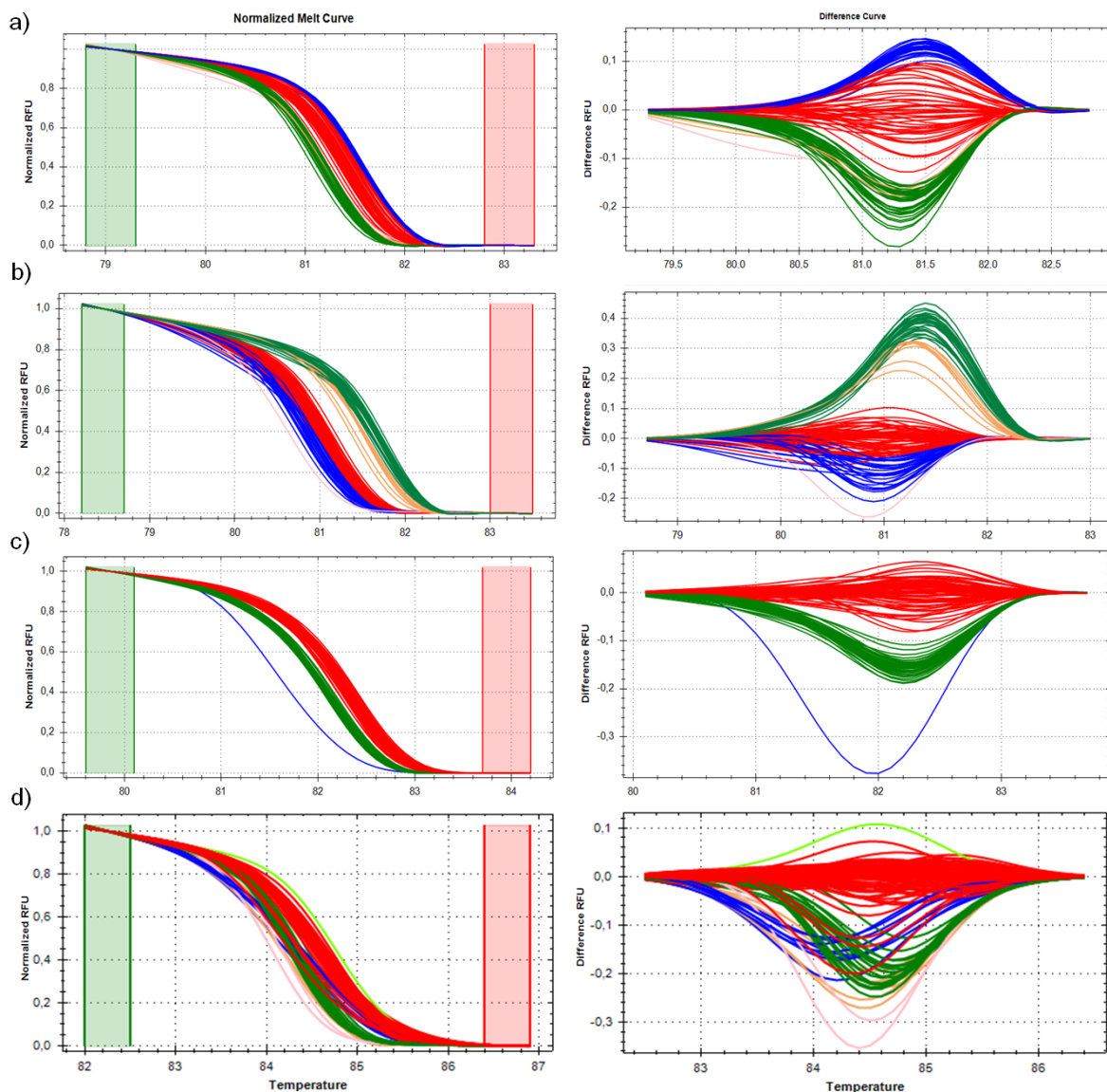
Anexo 2.Condiciones utilizadas por el GCMS en la cuantificación de capsaicina.

Anexo 3. Procedimiento para el cálculo del contenido de capsaicina y unidades Scoville.

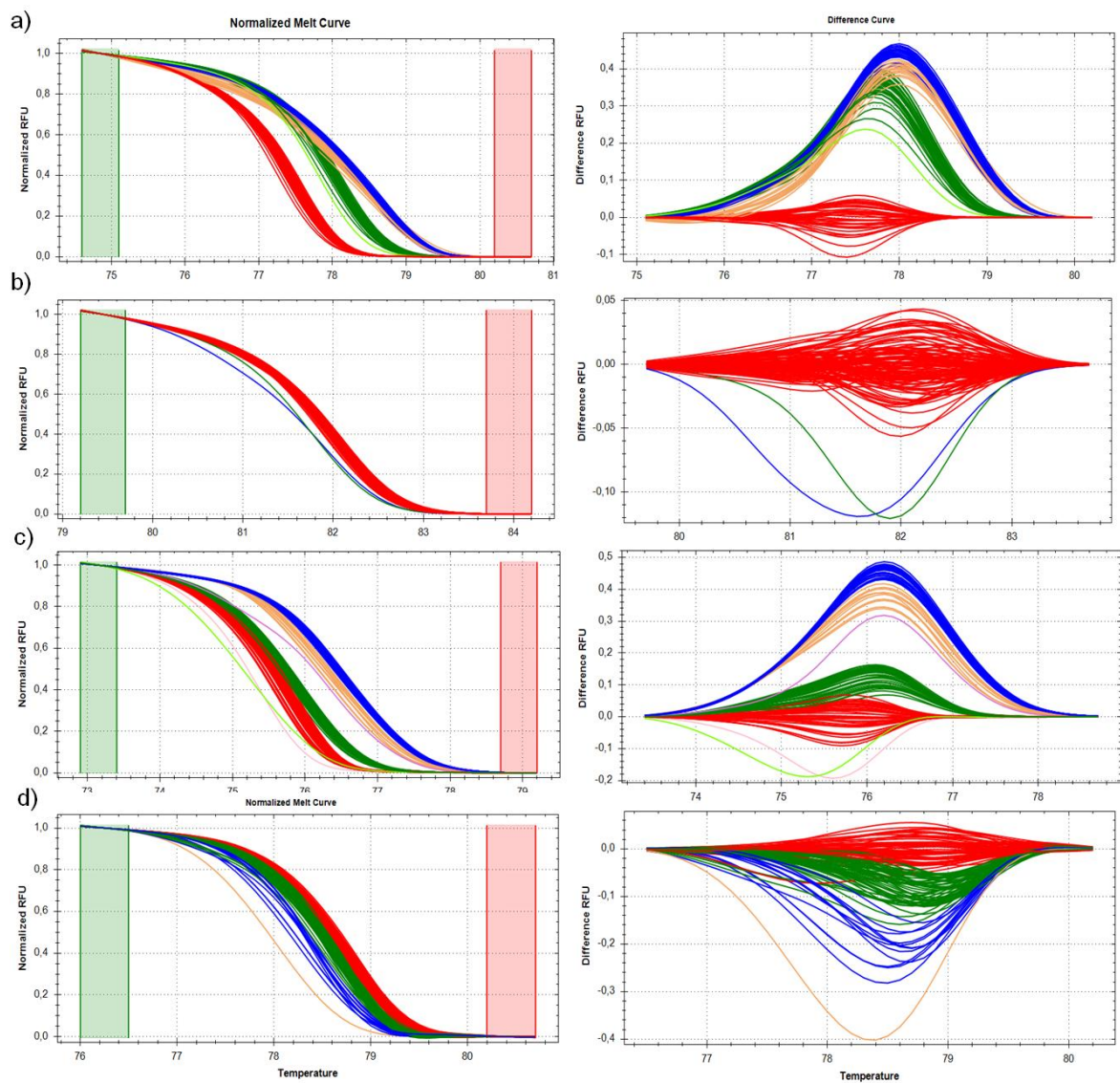
El resultado obtenido mediante GCMS en mg/L que es igual a $\mu\text{g/mL}$, es multiplicado por el volumen en mL extraído para cuantificación. Posteriormente se transforma el resultado de μg a mg, y como la extracción se desarrolló con base a 0.1g de fruto seco, se divide por esta cantidad para conocer el contenido de capsaicina con base a un gramo de fruto seco(mg/g). Finalmente, para conocer las unidades Scoville de la muestra, se multiplica este resultado por el factor 1.6×10^4 . A continuación un ejemplo realizado a partir de una de las muestras de ají Habanero evaluadas en el presente estudio:

$$9396.617 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 0.55 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1}{0.1 \text{ g}} = 51.68 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

$$51.68 \times 1.6 \times 10^4 = 826880 \text{ unidades Scoville}$$



Anexo 4. Curvas de disociación del ADN extraídas a partir de la técnica HRM de 120 individuos pertenecientes a las variedades comerciales de ají Cayena, Tabasco y Habanero. A la izquierda se observan las curvas normalizadas y a la derecha se muestra su diferenciación respecto a la curva más común. a) marcador Ng6 b) marcador Ng7 c) marcador Ng8 d) marcador Ng10.



Anexo 5. Curvas de disociación del ADN extraídas a partir de la técnica HRM de 120 individuos pertenecientes a las variedades comerciales de ají Cayena, Tabasco y Habanero. A la izquierda se observan las curvas normalizadas y a la derecha se muestra su diferenciación respecto a la curva más común. a) marcador Ng18 b) marcador Ng20 c) marcador Bd3 d) marcador Bd12.

Anexo 6. Comandos en RStudio para la estimación de la heredabilidad de diferentes rasgos usando parentescos estimados con marcadores microsatélites en *C. frutescens*, *C. chinense* y *C. annuum*.

```
library(readxl) #Paquete para importar datos en formato.xlsx

datos<-read_excel(file.choose(),sheet=1) # Comando para ubicar el archivo en formato .xlsx con los
datos fenotípicos y coeficientes de parentesco estimados usando Triadic IBD en el programa
Coancestry.

x<- datos[1:40,2] # Objeto que contiene las mediciones del rasgo, desde la fila 1 hasta el total de
datos (40 en este caso).

b<- x$`Rasgo` # Objeto con la matriz numérica del rasgo.

par<-datos$Parentesco #Objeto que contiene los coeficientes de parentesco.

varpar<-var(par) #Varianza del parentesco

prob<-mean(b) #Promedio del rasgo.

varb <- var(b) #Varianza del rasgo.

x1<-b-prob #Objeto que contiene cada valor del rasgo menos el promedio.

com<-combn(x1,2) # Combinatoria del objeto x1.

simf<-(com[1,]*com[2,])/varb #Similaridad fenotípica por pares de individuos. (Ver Ritland 1996a
[1a]).

covf<-cov(simf,par) #Covarianza de la similaridad fenotípica y el parentesco. El objeto simf debe
tener la misma dimensión que el objeto par.

becker<- ((1+F)/2) # Corrector de Becker (1984). F indica el valor de endogamia obtenido de la
genotipificación (Ecuación [4] Capítulo III).

h2<- becker*(covf/varpar) #Heredabilidad (Ecuación [5] Capítulo III).
```

Anexo 7. Ejemplo de heredabilidad usando parentescos estimados con marcadores microsatélites del rasgo “Total de frutos” en Tabasco.

```
> library(readxl)
> datos<-read_excel(file.choose(),sheet=1)
> x<- datos[1:40,2]
> x
# A tibble: 40 x 1
  `Total frutos`
      <dbl>
1           788
2           674
3           412
4            95
5           788
6           715
7           976
8           560
9           577
10          312
# ... with 30 more row

> b<- x$`Total frutos`
> b
[1] 788 674 412 95 788 715 976 560 577 312 146 572 394 401 348
[16] 636 791 512 1252 181 147 561 39 323 118 859 451 238 2 544
[31] 807 791 370 1199 682 572 880 600 459 646
> par<-datos$Parentesco
> par
[1] 0.0000 0.0035 0.2205 0.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0035 1.0000 0.0000 0.0035
[12] 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0000 1.0000 0.0000 0.0000 0.0000
[23] 0.0000 0.0000 0.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0035 0.0035 0.0000
[34] 0.0035 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0000 0.0000 0.2872 0.0000 0.0000
...
```

```

> varpar<-var(par)

> varpar
[1] 0.176587

> prob<-mean(b)

> prob
[1] 535.45

> varb <- var(b)

> varb
[1] 88427.48

> x1<-b-prob

> x1
[1] 252.55 138.55 -123.45 -440.45 252.55 179.55 440.55 24.55 41.55
[10] -223.45 -389.45 36.55 -141.45 -134.45 -187.45 100.55 255.55 -23.45
[19] 716.55 -354.45 -388.45 25.55 -496.45 -212.45 -417.45 323.55 -84.45
[28] -297.45 -533.45 8.55 271.55 255.55 -165.45 663.55 146.55 36.55
[37] 344.55 64.55 -76.45 110.55

> com<-combn(x1,2)

> com
      [,1] [,2] [,3] [,4] [,5] [,6] [,7] [,8] [,9] [,10]
[1,] 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55
      [,11] [,12] [,13] [,14] [,15] [,16] [,17] [,18] [,19] [,20]
[1,] 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55
      [,21] [,22] [,23] [,24] [,25] [,26] [,27] [,28] [,29] [,30]
[1,] 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55
      [,31] [,32] [,33] [,34] [,35] [,36] [,37] [,38] [,39] [,40]
[1,] 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 252.55 138.55

[ reached getOption("max.print")]

> simf<-(com[1,]*com[2,])/varb

> simf
[1] 0.395700530 -0.352574741 -1.257930699 0.721285953 0.512797042 1.258216300
[7] 0.070115106 0.118667319 -0.638175990 -1.112274062 0.104387256 -0.403982966
[13] -0.383990878 -0.535359540 0.287172055 0.729853990 -0.066973493 2.046475745
[19] -1.012313625 -1.109418049 0.072971119 -1.417867398 -0.606759852 -1.192242411

```

```

[25]  0.924062839 -0.241190254 -0.849520913 -1.523539860  0.024418907  0.775550190
[31]  0.729853990 -0.472527265  1.895107084  0.418548630  0.104387256  0.984039101
[37]  0.184355606 -0.218342154  0.315732180 -0.193423997 -0.690106111  0.395700530
[43]  0.281322630  0.690262793  0.038465444  0.065101394 -0.350106052 -0.610198263

...

> covf<-cov(simf,par)
> covf
[1] -0.00850694
> becker<- ((1+1)/2) # Para este caso el valor de F es 1.
> becker
[1] 1
> h2<- becker*(covf/varpar)
> h2
[1] -0.04817422

```

Anexo 8. Ejemplo de heredabilidad usando parentescos estimados con marcadores microsatélites del rasgo “Alto del Tallo” para las tres variedades comerciales evaluadas en conjunto.

```
> library(readxl)
> datos<-read_excel(file.choose(),sheet=1)
> x<- datos[1:114,2]
> x
# A tibble: 114 x 1
  `Alto`
  <dbl>
1      78
2      74
3      69
4      68
5      84
6      72
7      87
8      72
9      94
10     49
# ... with 104 more rows

b<- x$`Alto`
> b
[1] 78.0 74.0 69.0 68.0 84.0 72.0 87.0 72.0 94.0 49.0 61.0 90.0 92.0
[14] 72.0 60.0 43.0 78.0 87.0 84.0 62.0 48.0 78.0 84.0 80.0 30.0 96.0
...
> par<-datos$Parentesco
> par
[1] 1.0000 0.6958 1.0000 1.0000 0.6958 1.0000 1.0000 0.6957 1.0000 1.0000 0.6958
[12] 0.6958 0.6957 0.6957 0.6957 1.0000 0.6957 0.6957 0.3763 0.6957 0.6957 0.6957
[23] 1.0000 0.7232 0.6957 1.0000 1.0000 0.6957 1.0000 0.6957 0.6957 0.6955 0.6957
[34] 0.6957 0.6957 0.2675 0.6957 0.6957 0.6957 0.6957 0.0000 0.0000 0.0000 0.0000
```

```

...

[ reached getOption("max.print") ]

> varpar<-var(par)
> varpar
[1] 0.1285557
> prob<-mean(b)
> prob
[1] 77.91316
> varb <- var(b)
> varb
[1] 776.6955

> x1<-b-prob
> x1
[1] 0.08684211 -3.91315789 -8.91315789 -9.91315789 6.08684211 -5.91315789
[7] 9.08684211 -5.91315789 16.08684211 -28.91315789 -16.91315789 12.08684211
[13] 14.08684211 -5.91315789 -17.91315789 -34.91315789 0.08684211 9.08684211
[19] 6.08684211 -15.91315789 -29.91315789 0.08684211 6.08684211 2.08684211
[25] -47.91315789 18.08684211 12.08684211 0.08684211 11.08684211 12.08684211
[31] 2.08684211 -3.91315789 -1.91315789 -0.91315789 -10.91315789 6.08684211
...

> com<-combn(x1,2)
> com
      [,1]      [,2]      [,3]      [,4]      [,5]      [,6]
      [,7]      [,8]      [,9]     [,10]     [,11]     [,12]
     [,13]     [,14]     [,15]     [,16]     [,17]     [,18]
     [,19]     [,20]     [,21]     [,22]     [,23]     [,24]

...

[ reached getOption("max.print") ]

> simf<-(com[1,]*com[2,])/varb
> simf
[1] -4.375291e-04 -9.965777e-04 -1.108387e-03 6.805681e-04 -6.611485e-04
[6] 1.015997e-03 -6.611485e-04 1.798665e-03 -3.232772e-03 -1.891055e-03

```

```

[11] 1.351426e-03 1.575046e-03 -6.611485e-04 -2.002865e-03 -3.903630e-03
[16] 9.709791e-06 1.015997e-03 6.805681e-04 -1.779246e-03 -3.344582e-03
[21] 9.709791e-06 6.805681e-04 2.333292e-04 -5.357157e-03 2.022285e-03
...
[ reached getOption("max.print") ]

> covf<-cov(simf,par)
> covf
[1] 0.105388
> becker<- ((1+1)/2) # Para este caso el valor de F es 1.
> becker
[1] 1
> h2<- becker*(covf/varpar)
> h2
[1] 0.8197846

```

Anexo 9. Enlaces para la descarga de los datos utilizados en los ejemplos de los Anexos 7 y 8.

<https://drive.google.com/file/d/1iPfrgrZG2CyePJDKGdG1ykesCxzcAePu/view?usp=sharing>

<https://drive.google.com/file/d/1XUBRvptlNjvi52DnIkTnqOmNsffFiXf-/view?usp=sharing>