

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS COLECCIONES  
NACIONALES DE AJÍES *Capsicum spp.* DEL INSTITUTO  
NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA (INIA) Y LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA (UNALM)  
MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES”**

**Presentada por:**

**Ricardo Gabriel Lengua Cabrera**

**Trabajo Monográfico para Optar el Título de:**

**BIÓLOGO**

**Lima – Perú**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS COLECCIONES  
NACIONALES DE AJÍES *Capsicum spp.* DEL INSTITUTO NACIONAL  
DE INNOVACIÓN AGRARIA (INIA) Y LA UNIVERSIDAD  
NACIONAL AGRARIA LA MOLINA (UNALM) MEDIANTE  
MARCADORES MOLECULARES”**

Presentada por:

**Ricardo Gabriel Lengua Cabrera**

Trabajo Monográfico para Optar el Título de:

**BIÓLOGO**

Sustentada y aprobada por el siguiente Jurado:

---

Mg.Sc. Edgar Hugo Sánchez Infantas  
Presidente

---

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila  
Miembro

---

Mg.Sc. Rosa Amelia Espejo Joya  
Miembro

---

M.Sc. César López Bonilla  
Asesor

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
2.1. Los ajíes <i>Capsicum spp.</i> .....	3
2.1.1. Descripción botánica .....	3
2.1.2 Centro de origen .....	6
2.1.3. Clasificación taxonómica .....	7
2.2. Principales variedades cultivadas .....	9
2.3. Colecciones Nacionales de Ajíes .....	13
2.4. Tipos de caracterización .....	16
2.4.1 Caracterización morfo agronómica .....	17
2.4.2 Caracterización molecular .....	17
<b>III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS COLECCIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>NACIONALES DE AJÍES</b>	
3.1. Muestras .....	21
3.2. Metodología .....	21
3.2.1 Métodos de extracción de los Ácidos Nucleicos .....	21
3.2.2 Marcadores moleculares .....	22
3.2.3 Amplificación de marcadores mediante PCR .....	25
3.2.4 Análisis de datos .....	27
3.3. Resultados .....	29
<b>IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>34</b>
<b>V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción morfológica de la flor para especies domesticadas de <i>Capsicum</i> .	4
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica	7
<b>Tabla 3.</b> Especies silvestres, semidomesticadas y domesticadas de <i>Capsicum</i>	9
<b>Tabla 4.</b> Distribución de ajíes a nivel provincial	10
<b>Tabla 5.</b> Especies y nombres comunes de <i>Capsicum</i> producidas en el Perú (Nativo y No Nativo).	13
<b>Tabla 6.</b> Número de accesiones ingresadas al banco de germoplasma de <i>Capsicum</i> Programa de Hortalizas, UNALM.	14
<b>Tabla 7.</b> Número de accesiones ingresadas al banco de germoplasma de <i>Capsicum</i> INIA.	15
<b>Tabla 8.</b> Principales marcadores polimórficos de DNA y sus características más Importantes.	19
<b>Tabla 9.</b> Listado de primers microsatélites de <i>Capsicum</i> evaluados en INIA	27
<b>Tabla 10.</b> PIC de 14 primers evaluados en 408 accesiones de la Colección de Ajíes del INIA.	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplos de flores y frutos de las especies cultivadas: a) *C. annum*; ..... 5  
b) *C. chinense*; c) *C. frutescens*; d) *C. baccatum*; y e) *C. pubescens*.
- Figura 2.** Mapa de Bolivia, en negro, el territorio boliviano ..... 7  
(antiguamente alto Perú) donde se acepta que se originó el género *Capsicum*.
- Figura 3.** Lugares de prospección a Nivel Nacional ..... 11
- Figura 4** Mapa de la procedencia de las accesiones ingresadas al banco de ..... 15  
germoplasma de *Capsicum* del Programa de Hortalizas, UNALM.
- Figura 5.** Perfil electroforético y agrupamiento de 110 individuos de la especie ..... 29  
*C. chinense* evaluados con la combinación de iniciadores AFLP: E37/M33.
- Figura 6.** Variabilidad genética de una colección de *C. chinense* del norte del Perú ..... 30
- Figura 7.** Análisis factorial de correspondencia de las accesiones de ají del INIA ..... 33  
agrupados por especie.

## RESUMEN

El ají *Capsicum spp.* es un fruto nativo que se originó en los andes peruanos y en las selvas de Bolivia, antiguamente Alto Perú. El cuál se consume directamente como verdura fresca o como condimento; y se lo utiliza en la industria farmacéutica como medicamento, colorante y otros usos potenciales que se derivan de la capsaicina y oleorresinas, lo que demuestra ser un recurso de amplísimo rango de aprovechamiento para su industrialización.

Debido a ello, las variedades de ajíes no explotadas en sus centros de origen ofrecen grandes oportunidades para la diferenciación de productos de alto valor lo cual conllevaría a un adecuado aprovechamiento y alivio de la pobreza. Por esta razón, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y La Universidad Agraria La Molina (UNALM) llevaron a cabo colectas a nivel nacional de este importante recurso genético. Los bancos de germoplasmas de ají obtenidos mediante estas colectas son necesarios de caracterizar tanto a nivel agronómico, bioquímico y molecular, con el fin de poder para detectar características de interés agrícola o industrial. La caracterización molecular llevada a cabo mediante el uso de marcadores moleculares como los AFLP y microsatélites (SSR), nos ofrece una herramienta versátil con la cual se podría evaluar una característica deseable como la pungencia, resolver problemas taxonómicos y eliminación de accesiones duplicadas. Datos que son básicos para iniciar un programa de mejoramiento genético y garantizar la preservación de la diversidad que ofrece este género.

Por lo tanto, en este trabajo se busca recopilar la información del estado actual de las caracterizaciones moleculares de las Colecciones Nacionales de Ajíes *Capsicum spp.*, mediante el uso marcadores moleculares.

Palabras claves: “Colección Nacional”, “*Capsicum*”, “marcadores moleculares”

## ABSTRACT

The pepper *Capsicum* spp, it is a native fruit that originated in the Peruvian Andes and in the jungles of Bolivia, formerly Upper Peru. Which is consumed directly as fresh vegetables or as a seasoning; and it is used in the pharmaceutical industry as a medicine, dye and other potential uses that are derived from capsaicin and oleoresins, which proves to be a resource of very wide range of use for its industrialization.

As a result, the varieties of chili not exploited in their centers of origin offer great opportunities for the differentiation of high value products, which would lead to an adequate use and alleviation of poverty. For this reason, the National Institute of Agrarian Innovation (INIA) and the Agrarian University La Molina (UNALM) carried out collections at national level of this important genetic resource. The banks of chili germplasm obtained through these collections are necessary to characterize both agronomically, biochemically and molecularly, to be able to detect characteristics of agricultural or industrial interest. The molecular characterization carried out using molecular markers such as the AFLP and microsatellite (SSR), offers us a versatile tool with which a desirable characteristic such as pungency, solve taxonomic problems and elimination of duplicate accessions could be evaluated. Data that are basic to start a program of genetic improvement and guarantee the preservation of the diversity that this genre offers.

Therefore, in this work we seek to collect information on the current state of the molecular characterizations of the National Collections of Ajíes *Capsicum* spp., By using molecular markers.

Keywords: "National Collection", "*Capsicum*", "molecular markers"

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha logrado concientizar sobre el valor de los recursos genéticos no solo desde el punto de vista agrícola y alimentario, sino también como definidores de identidad cultural como el caso de los ajíes. Por lo cual Perú como centro de origen de esta especie y a través del Instituto de Innovación Agraria (INIA) y la Universidad Agraria La Molina (UNALM) han llevado a cabo colectas nacionales de ají. Este género tiene alrededor de treinta especies diferentes de *Capsicum* de las cuales cinco han sido domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*. (IBPGR, 1983). Estas cinco especies tienen numerosos híbridos y variedades que han dificultado su sistemática. Sin embargo, debido a que los frutos de los ajíes *Capsicum spp.* pueden variar enormemente en color, forma y tamaño dentro de la misma especie, se ha llegado a confusiones sobre la relación entre los taxones, por lo que hoy en día se hace uso de herramientas químicas y moleculares para ayudar a distinguir las diferencias entre distintas variedades de una misma especie y entre especies.

La conservación de las colecciones nacionales de ají en bancos de germoplasmas a pesar de ser una actividad esencial, no se justifica sin su utilización, por eso es necesario avanzar con la caracterización de las accesiones tanto a nivel morfológico como a nivel genotípico para detectar características de interés agrícola o industrial, las cuales podrían obtener beneficios para variedades locales promoviendo oportunidades para diferenciación frente a la creciente demanda de alimentos e ingredientes de alto valor.

En el presente trabajo se hace una revisión de los estudios sobre caracterización molecular de las accesiones de los ajíes *Capsicum spp.* de la UNALM y el INIA, para lo cual se emplearon el uso de marcadores moleculares tipo AFLP y microsatélites respectivamente.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

El género *Capsicum* junto con otros 84 géneros más, constituyen la familia Solanáceas; entre las cuales se encuentran el tomate, la papa, el tabaco, la berenjena, el lulo, la uchuva y medicinales. En general, las especies del género *Capsicum* son diploides y poseen 12 pares de cromosomas (Sihna, 1950), que incluye 30 especies, siendo cinco de ellas cultivadas básicamente por su uso como especie y vegetal hace miles de años (Andrews, 1995). Estas son: *C. annuum* L., *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. bacatum* (Bosland & Votava, 2000; Wang & Bosland, 2006).

Los ajíes *Capsicum spp.* son fuente rica de antioxidantes, flavonoides, carotenoides, capsaicinoides, etc. Los capsaicinoides son alcaloides pungentes y acres, entre ellos, la capsaicina tiene importancia medicinal (propiedades anticancerígenas, antiartríticas, etc.), y farmacológicas (antioxidante y analgésico).

En el ámbito mundial se destinan 986,00 Ha para su cultivo, totalizando una producción de 7'205,000 TM con un rendimiento promedio de 7,308 Kg./ha. En el Perú se cultivan más de 2,000 ha. con una producción promedio de 5,532 Kg./ha. Las zonas donde se producen en mayor escala son los valles de Lima, Chincha, Cañete, Tacna, Oxapampa y Cerro de Pasco (Ortiz, 1983).

El Perú muestra una importante reserva genética que ha dado origen a variedades locales muy populares que en su mayoría no han sido caracterizadas. En los últimos años el empleo de técnicas moleculares ha permitido complementar la información obtenida a través de la caracterización morfológica. Es por ello la importancia de caracterizarlos mediante el uso de marcadores moleculares. Portis et al. (2006), desarrollo nuevos microsatélites para la resolución de mapas genéticos, obteniendo

finalmente 49 SSRs polimórficos de gran utilidad para evaluar la diversidad genética en *Capsicum spp.* Minamiyama *et al.* (2007) muestran la importancia del desarrollo de SSR para generar mapas de ligamiento, encontrar Quantitative trait locus QTLs de resistencia a *Phytophthora capsici* en los pimientos *C. annuum* y apoyo a los programas de selección asistida por marcadores (MAS). Un estudio realizado por Ibiza *et al.* (2011) con 10 marcadores microsatélites y 4 AFLP, analizó la diversidad genética de las accesiones de ajíes de Perú, Ecuador y Bolivia, la cual reveló que los microsatélites mostraron una mejor clasificación geográfica en comparación con los AFLP. Además de una alta diversidad entre los tres países en donde la mayoría de muestras se colectaron en jardines, lo cual demostró la importancia de la conservación de este recurso genético.

Los estudios mencionados anteriormente demuestran la gran utilidad de los marcadores moleculares como son los AFLP y microsatélites (SSR), los cuales aportan información útil para el conocimiento de la diversidad genética, búsqueda de características agronómicas deseables, programas de mejoramiento genético, entre otros.

## **2.1. Los ajíes *Capsicum spp.***

### **2.1.1. Descripción botánica**

El ají (*Capsicum spp.*) es considerado como un cultivo hortícola está ampliamente difundido en todas las regiones templadas tropicales y subtropicales del sur de los continentes. Por su origen fue un cultivo de habitantes de América precolombina, y era el equivalente de la pimienta para los asiáticos y europeos. Las variedades de ají pueden ser picantes y no picantes. Hoy se sabe que la razón química del picor se debe a un alcaloide denominado capsaicina o capsicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida), que consiste en una sustancia fenol etérica percibido incluso en soluciones de 1:100000 (Brack, 2003). Actualmente las especies de *Capsicum* están muy difundidas en el mundo por sus propiedades culinarias, por ser sazonzadoras, son base de pigmentos requeridos por la cosmetología, más aún por sus propiedades vitamínicas y medicinales.

**Tipo de planta:** La planta de ají es un semiarbusto perennes de forma variable y alcanza entre 0.30 m a 1.50 m de altura, dependiendo principalmente de la variedad, de las condiciones climáticas y de la fertilización. Son plantas monoicas, tiene los dos

sexos incorporados en una misma planta, y autógamias, es decir que se autofecunda; aunque puede experimentar altos porcentajes de polinización cruzada, es decir, ser fecundada con el polen de una planta vecina. La longitud del estilo puede variar de acuerdo con la variedad o especie. En los tipos silvestres el estilo es más largo que los estambres, longistilas; mientras que, en las domesticadas, es usualmente más corto, brevistilas.

En la actualidad la descripción de los ajíes se realiza mediante la utilización de descriptores estandarizados propuestos por el IPGRI (1995). Sin embargo, tradicionalmente algunos caracteres importantes han sido los del picor (pungencia), color, forma, sabor, tamaño y por el uso para el que puedan ser destinados.

**Flor:** Este género presenta diferentes colores de flor, que hacen referencia a su especie. Se definen dos grupos de flores: blancas y purpuras, las cuales se describen morfológicamente en la Tabla 1 para el caso de las especies domesticadas.

**Tabla 1. Descripción morfológica de la flor para especies domesticadas de *Capsicum*.**

Color de corola	Especie domesticada
Púrpura, flor solitaria, pedicelo erecto con flor tumbada	<i>C. pubescens</i>
Blanca - blanca lechosa, flor solitaria, pedicelo pendiente	<i>C. annum</i>
Blanca verdosa, flor solitaria, pedicelos erectos con flor tumbada	<i>C. frutescens</i>
Blanca verdosa, flor solitaria, pedicelos erectos o pendientes, dos o más flores en cada nudo	<i>C. chinense</i>
Manchas amarillas difusas en la base de los pétalos, flor solitaria con pedicelos erectos o pendientes	<i>C. baccatum</i>

FUENTE: Muñoz, 2002.

**Fruto:** El fruto es una baya con características muy variables (Figura 1) El peso fluctúa entre unos pocos gramos hasta medio kilo. Tienen formas redondas, acorazonadas, largas, cilíndricas, cónicas, rectangulares y hasta cuadradas. Los frutos inmaduros pueden ser de color blanco, verde café y hasta negro. En estado maduro predominan los

de color rojo, pero también hay de color marfil, amarillo, anaranjado, café, lila, morado y negro. Las semillas son pequeñas, planas, y de color crema a pardo, dispuestas en la placenta. Las semillas del *C. pubescens* son de color negro, únicas en el género (Nuez *et al.*, 1996).



**Figura 1.** Ejemplos de flores y frutos de las especies cultivadas: a) *C. annuum*; b) *C. chinense*; c) *C. frutescens*; d) *C. baccatum*; y e) *C. pubescens*.

FUENTE: Van Zonneveld *et al.*, 2015.

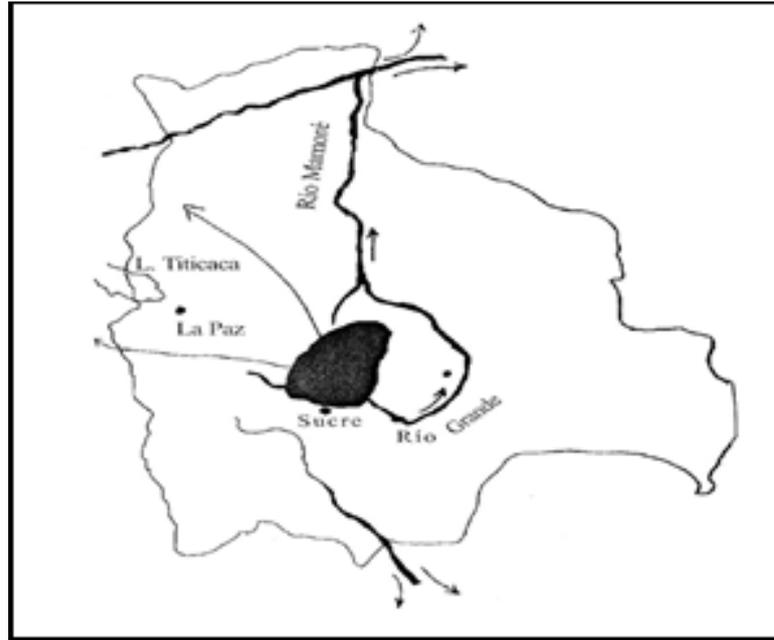
**Capsaicina:** El grado de pungencia de los frutos se mide por el contenido de la capsaicina, La capsaicina es un alcaloide de composición compleja, ya que es una mezcla de varias amidas que son conocidas como capsaicinoides, siendo la capsaicina la más importante entre ellas.

El mayor contenido de capsaicina en los frutos de ají se da en la placenta del fruto, específicamente en el septo. La formación de la capsaicina se inicia a los pocos días de cuajado del fruto, alcanzado mayor contenido a momento de la maduración. El contenido de la capsaicina depende de la variedad y de la interacción genotipo por ambiente, donde temperaturas elevadas favorecerían la formación de esta en comparación con temperaturas suaves. Se consideran variedades dulces de ají cuando el contenido de capsaicinoides está por debajo de 10 ppm, que es el límite para que las

papilas gustativas puedan detectar el sabor picante. En la actualidad el grado de pungencia es usualmente expresado en unidades Scovilles (uS), en honor a Wilburt Scoville quien desarrollo el método en 1912.

### **2.1.2. Centro de origen**

El centro de origen de los ajíes ha sido reportado por varios autores, sin embargo, no hay un consenso para establecer dicho punto. De acuerdo con Pickersgill (1969), el género *Capsicum* se habría originado en América del Sur y Central. Los seguimientos arqueológicos detallados en su publicación y los hallazgos arqueológicos habrían relacionado al género *Capsicum* con las civilizaciones Maya y Azteca (México y Centro América) y las precolombinas de América del Sur. Según sus videncias, el origen se remontaría hacia unos 7.000 – 4000 años en las cavernas de Tamaulipas y Tehuacan en México, América Central y en Perú. Otros autores habrían señalado otros puntos de origen, como Cabieses (2002), quien citó que los ajíes son originarios de la zona de Bolivia y Perú (Figura 2), donde evoluciono en las regiones andinas más secas de estos países y posteriormente migro hacia tierras bajas tropicales (Walsh *et al.*, 2001). Según sus reportes, habría sido traído al Viejo Mundo por Colón en su primer viaje (1493) y en el siglo XVI ya se había difundido su cultivo en España, desde donde se distribuyó al resto de Europa y del mundo con la colaboración de los portugueses. Su introducción en Europa supuso un avance culinario, ya que vino a complementar e incluso sustituir a otro condimento muy empleado como era la pimienta negra (*Piper nigrum* L.), de gran importancia comercial entre Oriente y Occidente.



**Figura 2. Mapa de Bolivia, en negro, el territorio boliviano (antiguamente alto Perú) donde se acepta que se originó el género *Capsicum*.**

FUENTE: Cabieses, 2002.

### 2.1.3. Clasificación taxonómica

En la Tabla 2 se resume la clasificación taxonómica del género *Capsicum*.

**Tabla 2. Clasificación taxonómica**

Reino	Vegetal
Tipo	Fanerógama
División	Spermatophyta
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Simpétala o Gamopétala
Orden	Solanales o Tubiflorales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>

FUENTE: Zapata *et al.*, 1992

El género *Capsicum* comprende especies originarias del Nuevo Mundo. Debouck y Libreros (1993) revisaron la información existente sobre el número de especies y reconocen entre 10 y 25, considerando 11 especies dudosas de pertenecer al género. Basados en el color de la flor (blanca y morada) se distinguen dos grupos de especies (IBPGR, 1983). El grupo de flor morada reúne las especies *Capsicum eximium*, *C. cardenassi* y *C. pubescens*. El grupo de flor blanca lo conforman dos subgrupos, el primero constituido por *C. baccatum* con sus dos variedades botánicas *C. baccatum* var. *baccatum* y *C. baccatum* var. *pendulum* (Eshbaugh, 1977), y el segundo conformado por *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*. Se presentan diferencias morfológicas entre los dos grupos, lo cual dificulta el cruzamiento entre ellos (Eshbaugh, 1977; Gil Ortega, 1990). La especie *C. chacoense*, de flor blanca, parece ser el nexo entre los dos grupos (Jensen *et al.*, 1979).

Hunziker (1979), concide con Debouck y Liberos, citando también 25 especies, mientras que Eshbaugh (1980) adiciona especies a esta lista (Tabla 3).

**Tabla 3. Especies silvestres, semidomesticadas y domesticadas de *Capsicum*.**

<b>Especie Silvestre</b>	<b>Especie Semidomesticada</b>	<b>Especie domesticada</b>
<i>C. buforum</i> A. T. Hunz	<i>C. annuum</i> var <i>labriusculum</i>	<i>C. annuum</i> L.
<i>C. campylopodium</i> Sendt	<i>C. baccatum</i> var <i>baccatum</i>	<i>C. baccatum</i> L. var <i>pendulum</i> (willd)
<i>C. chacoense</i> var <i>tometosum</i>	<i>C. baccatum</i> var <i>praetermissum</i>	<i>C. chinense</i> jacq
<i>C. ciliatum</i>	<i>C. chinense</i> (forma silvestre)	<i>C. frutescens</i> L.
<i>C. coccineatum</i>	<i>C. frutescens</i> (forma silvestre)	<i>C. pubescens</i> Ruiz y pavón
<i>C. cornutum</i> (Hiern) A. T. Hunz	<i>C. cardenasii</i> Heiser & Smith	
<i>C. dimorphum</i> (Miers)	<i>C. eximium</i> A. T. Hunz	
<i>C. flexuosum</i> Send	<i>C. tovari</i>	
<i>C. dusenii</i> Bitter	<i>C. chacoense</i> A. T. Hunz	
<i>C. geminifolium</i> A. T. Hunz	<i>C. galapagoense</i> A. T. Hunz	
<i>C. hookerianum</i> (Miers)	<i>C. annuum</i> var <i>avicularen</i>	
<i>C. lanceolatum</i> (Morton & Standley)		
<i>C. minutiflorum</i>		
<i>C. mirabile</i> Mart.		
<i>C. parvifolium</i> Sendt		
<i>C. schottianum</i>		
<i>C. scolnikianum</i> A. T. Hunz		
<i>c. pendulum</i>		
<i>C. villosum</i> Send		

FUENTE: Pickersgill, 1983.

## 2.2. Principales variedades cultivadas

El ají es probablemente una de las especias más utilizadas a nivel mundial. Actualmente, existen variedades no picantes como el pimiento, hasta variedades muy picantes como el ají habanero. Las especies de *Capsicum* domesticadas, son: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*.

Las variedades cultivadas de *Capsicum* está distribuido a nivel nacional desde Tacna hasta Piura los departamentos con mayores áreas son Tacna Arequipa, Moquegua, Ica, Lima, Ancash, La Libertad, Lambayeque y Piura. Las variables de producción pueden variar dependiendo del clima y de las diferentes zonas y/o regiones de producción del Perú. Los *Capsicum* se producen desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm, de las quebradas y/o valles Interandinos, las condiciones óptimas se encuentran por debajo de los 1000 msnm.

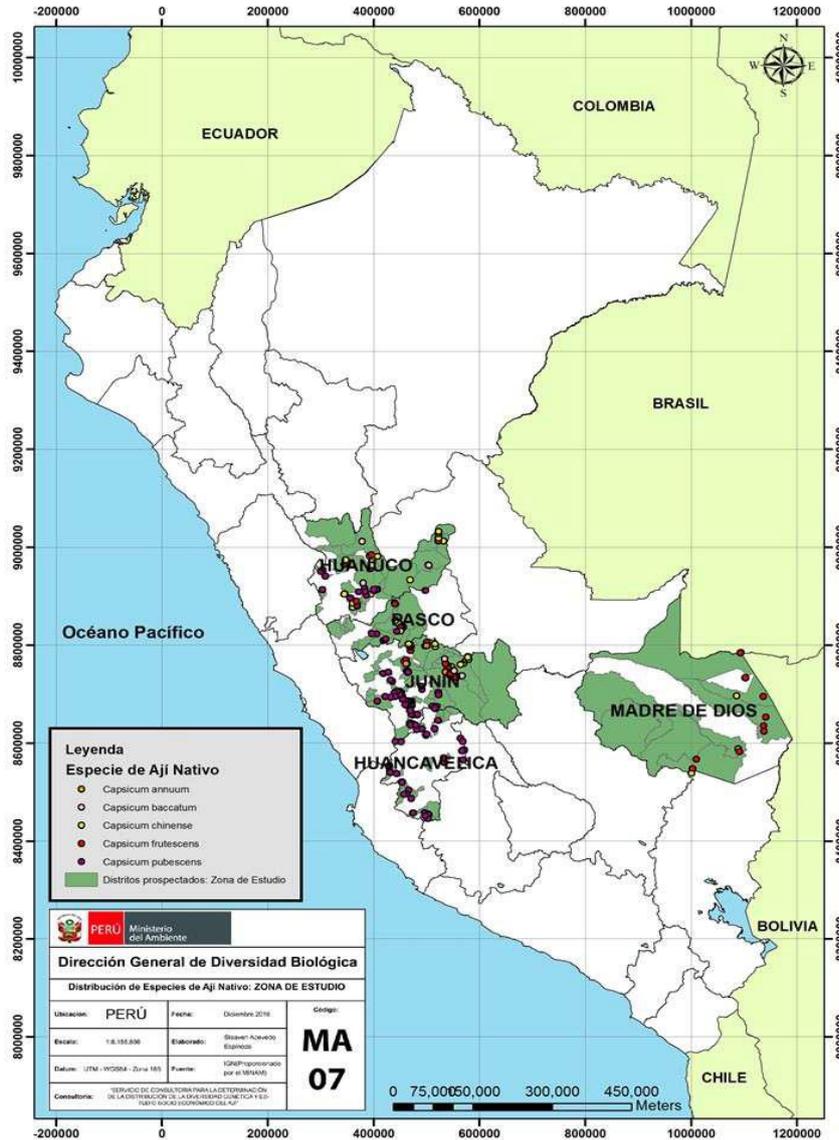
Las zonas de producción más comunes a lo largo de la costa peruana son: Piura, Motupe, Olmos, Chao, Virú, Chimbote, Huarney, Barranca, Supe, Huacho, Huaral, Huaura, Sayan, Cañete, Chincha, Ica, Nazca, Arequipa, Moquegua y Tacna. Los rendimientos promedios oscilan entre 4.0 a 5.0 t/ha a nivel nacional usando semilla certificada, en algunas zonas como Villacurí (Ica) y Arequipa se estaría obteniendo alrededor de 7.0 - 9.0 t/ha.

En cuanto a las variedades nativas el para finales del año 2016, la Dirección General de Diversidad Biológica del MINAM emitió el primer informe sobre la Determinación de la distribución de la diversidad genética y estudio socioeconómico de las variedades de *Capsicum* que se hayan en los departamentos de Junín, Pasco, Huánuco Huancavelica y Madre de Dios, siendo el *C. pubescens* la especie que se encuentra con mayor frecuencia con un 57.40% de todas las prospecciones realizadas, seguida por la variedad *C. chinense* con 19.22%, *C. frutescens* 14%, *C. baccatum* 7.79%, y por ultimo *C. annuum*. 1.82%, como se muestra en la Tabla 4 y Figura 3.

**Tabla 4. Distribución de ajíes a nivel provincial**

DEPARTAMENTO	<i>C. annuum</i>	<i>C. baccatum</i>	<i>C. frutescens</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. pubescens</i>	TAMAÑO MUESTRAL
Huancavelica	0%	9%	0	3%	87.9%	66
Huánuco	0%	10%	11%	25%	54.3%	81
Junín	3.5%	6%	13%	19%	58.7%	172
Madre de Dios	0%	4%	79%	17%	0%	24
Pasco	2.4%	14%	5%	36%	43%	42
TOTAL	1.8%	8%	14%	19%	57%	385

FUENTE: Elaborado en base a la información de la Dirección General de Diversidad Biológica del MINAM (2016).



**Figura 3. Lugares de prospección evaluados por el MINAM (2016).**

FUENTE: Dirección General de Diversidad Biológica del MINAM, 2016.

Según dicho informe, Huancavelica, Huánuco y Junín, mostraron tener la mayor prevalencia de ajíes (Tabla 4). En la región Huancavelica se hallaron principalmente las variedades *C. pubescens* (rocoto) en un 87.8% y *C. baccatum* en un 9.09%, además de *C. chinense* en los distritos de San Miguel de Mayocc y Ocoyo de las provincias de Churcampa y Huayatar pero en un menor porcentaje. En lo que respecta a la región Huánuco de las 81 prospecciones realizadas se ha observado en 44 la presencia de *C. pubescens* y 20 de *C. chinense* conocidos con los nombres de ají charapita o ají ayuyo. Por otro lado, Junín, departamento donde se colectó un total de 172 prospecciones, registró 101 correspondientes a *C. pubescens* (Rocoto) que a la observación

morfológica no tienen mayor variación salvo el tamaño del fruto siendo más grandes los que son cultivados en campos destinados para la comercialización en algunos distritos (Mariscal Castilla, Andamarca, Monobamba) en comparación con los frutos de plantas que son conservadas o cultivadas en huertos familiares donde se encuentran 2 a 3 plantas en cada huerto. Se registraron 33 prospecciones de ají charapita rojo, conocido como rocotito encontrados en la provincia de Satipo que pertenecen a la especie de *C. chinense*, el *C. frutescens* denominados localmente como pipi de mono o pinchito de mono fueron reistrados en 22 oportunidades, así como *C. baccatum* y *C. annuum* en 10 y 6 prospecciones respectivamente.

Este informe concluye que en el Perú no existe hasta la fecha un banco completo de germoplasma para identificar y tener registro de cada una de las especies *Capsicum* que se cultivan o que alguna vez fueron cultivadas dentro de nuestro territorio. Debido a la poca información que se tiene sobre el género de *Capsicum*, no se ha podido identificar en algunos casos que especies son oriundas de nuestro país y cuáles no lo son, a pesar del esfuerzo desplegado por INIA. Este no es el único inconveniente, también existe el problema de los nombres diferentes que recibe una misma variedad de *Capsicum* en las diferentes zonas de cultivo del territorio peruano, lo cual hace difícil su separación como variedades distintas o una variedad única, complicando su identificación por nombres científicos; aun así, en la Tabla 5 se ha logrado detalla un listado de variedades con sus nombres comunes, además de las regiones productoras.

Los *Capsicum* pertenecen a un género que abarca un conjunto de variedades de especies que se pueden encontrar en distintas partes del mundo, sin embargo, hace falta hacer investigación para identificar si son variedades diferentes o la misma variedad de *Capsicum*, y así evitar la confusión en identificaciones futuras de variedades diferentes de aquellas que por sus características genóticas se asemejan a la variedad.

**Tabla 5. Especies y nombres comunes de *Capsicum* producidas en el Perú (Nativo y No Nativo)**

<b>Especie</b>	<b>Variedades (Nombres Comunes)</b>	<b>Regiones Productoras</b>
<i>Capsicum annuum</i>	Cerezo, Cayena, Jalapeño Morrón, Paprika, Piquillo, Chipotle, Guindilla, Pimentón, Guajillo, Pasillo	Lambayeque y zona norte del Perú.
<i>Capsicum baccatum</i> <i>var. Pendulum</i>	Escabeche, Amarillo o Criollo Mirasol, Pacae, Cacho de cabra o de venado Ayuclo	Costa de Lambayeque al sur, Arequipa, Moquegua, Tacna, Selva Central, San Martín.
<i>Capsicum chinense</i>	Panca, especial, colorado, rosado Limo (paringo, miscucho, banana) Mochero Ají Dulce Habanero	Costa central y sur, Costa de Lambayeque al Norte, La Libertad, Amazonía.
<i>Capsicum frutescens</i>	Pipi de Mono, Montana Charapita Arnauco Tabasco	Costa y selva, Amazonía, San Martín y Norte Chico.
<i>Capsicum pubescens</i>	Rocoto, locoto	Sierra, selva central.

FUENTE: INIA y UNALM, 2009.

### 2.3. Colecciones nacionales de ajíes

Las colecciones de Ajíes del Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA y la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) contienen más de 900 accesiones de *Capsicum spp.* INIA con 413 accesiones de ají (*C. annuum L.*, *C. baccatum L.*, *C. chinense Jacq.*, *C. frutescens L.*) y 296 de rocoto (*C. pubescens*) y la UNALM aproximadamente 300 accesiones, colectadas en distintas regiones del Perú, y representan la colección de *Capsicum* más grande y diversa que alguna vez se haya reunido. Es de importancia histórica para el Perú y el mundo que esta diversidad tan espectacular se haya reunido y esto contribuirá significativamente a dilucidar la taxonomía inter e intra específica de la diversidad cultivada de los ajíes *Capsicum spp.*, a establecer una base científica para fortalecer su conservación in situ y ex situ, y que beneficiará a los productores, consumidores e investigadores de *Capsicum* a nivel mundial. El INIA conserva las 413 accesiones de Ají en la Estación Experimental Donoso Huaral ex situ, además conserva las 296 accesiones de *C. pubescens* (rocoto) ex situ en la Estación Experimental Agraria Santa Rita de Siguan en Arequipa.

En la actualidad estas colecciones nacionales continúan realizando esfuerzos importantes en el registro y almacenamiento de los datos de pasaporte y la caracterización de estas accesiones tanto a nivel agro morfológico, bioquímico y molecular.

**Tabla 6. Número de accesiones ingresadas al banco de germoplasma de *Capsicum*  
Programa de Hortalizas, UNALM.**

Especie	Procedencia			Total	%
	Costa	Sierra	Selva		
<i>C. annuum</i>	15	0	1	16	<b>4.3</b>
<i>C. baccatum</i>	34	8	42	84	<b>22.8</b>
<i>C. chinense</i>	110	5	115	230	<b>62.3</b>
<i>C. frutescens</i>	0	0	11	11	<b>3</b>
<i>C. pubescens</i>	0	10	18	28	<b>7.6</b>
<b>Total</b>	<b>159</b>	<b>23</b>	<b>187</b>	<b>369</b>	<b>100</b>
<b>%</b>	<b>43.1</b>	<b>6.2</b>	<b>50.7</b>	<b>100</b>	

FUENTE: UNALM, 2016.



**Figura 4. Mapa de la procedencia de las accesiones ingresadas al banco de germoplasma de *Capsicum* del Programa de Hortalizas, UNALM**

FUENTE: UNALM, 2016.

**Tabla 7. Número de accesiones ingresadas al banco de germoplasma de *Capsicum***

INIA

Especie	Estación Experimental		Total	%
	Donoso - Huaral	Santa Rita - Arequipa		
<i>C. annuum</i>	43	0	43	6
<i>C. baccatum</i>	68	0	68	9.5
<i>C. chinense</i>	195	0	110	15.5
<i>C. frutescens</i>	36	0	195	5
<i>C. pubescens</i>	0	296	296	7.6
<i>Capsicum sp.</i>	71	0	71	41.7
<b>Total</b>	<b>413</b>	<b>296</b>	<b>709</b>	<b>100</b>
<b>%</b>	<b>58</b>	<b>42</b>	<b>100</b>	

FUENTE: Elaboración propia.

## 2.4. Tipos de caracterización

Dentro de los marcadores más utilizados para caracterizar están los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo et al. 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Para la gran mayoría de investigaciones esto significa una espera de varios años. Además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell 1992; Phillips et al. 1995). Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. El uso de estas herramientas obtiene medidas genotípicas de variación y permite hacer un muestreo amplio de diversidad, incrementando la resolución generada por los métodos tradicionales.

Además de los marcadores morfológicos y moleculares, hay otros métodos que también permiten la caracterización. Herramientas bioquímicas permiten la determinación de compuestos de bajo peso molecular como flavonoides, alcaloides, aminoácidos no proteicos y aceites esenciales; del mismo modo es posible identificación de molecular proteicas como proteínas de reserva, isoenzimas, etc.

Pero no solo la caracterización es a nivel funcional, sino también que los caracteres influidos por el ambiente cumplen un papel importante para la definición de paquetes de marcadores, es así que también a nivel ecológico, geográfico, agronómico, etc, también es posible realizar caracterizaciones. Para esto es necesario realizar ensayos repetitivos en diferentes localidades y tratamientos estadísticos de los resultados, algunos ejemplos de caracteres agronómicos son los componentes de rendimiento, es decir la producción, la adaptación a estrés abiótico en cuanto a salinidad, temperaturas altas o bajas, o incluso la resistencia natural a plagas o enfermedades. Por otro lado, la pungencia, jugosidad, dulzor, grados Brix, y acides total son también modos de evaluación que corresponden a una caracterización organolépticas y bioquímica. Estas herramientas también son bastante

útiles al momento de caracterizar dando incluso mayor robustez a ensayos basados en caracterización morfológica y/o molecular.

#### **2.4.1 Caracterización morfo agronómica**

En investigaciones realizadas en las que se ha estudiado la diversidad morfológica y genética es común medir un gran número de variables (IPGRI/AVRDC-CATIE 1995; Latournerie et al. 2002; Cherian & Indira 2003; Medina et al. 2006; Pardey et al. 2006; Castañón et al. 2008). Normalmente se hace uso de paquetes de marcadores, los cuales deben ser capaces de diferenciar a nivel de especie, variedad botánica, variedad de cultivo, clones para el caso de especies cultivadas, y en aquellas especies con menor grado de domesticación también deben, además, ser capaces de llegar a diferenciar de, variedad botánica, poblaciones, subpoblaciones, etc.

Para el caso de los *Capsicum spp.* hoy en día existen manuales que permiten la evaluación de marcadores morfológicos, tal es el caso del manual de descriptores para Chile (IPGRI- AVRDC/CATIE, 1995), en el cual se describen las variables a medir como altura, de la planta, diámetro del tallo, forma de la hoja, forma del tallo y fruto, así como el largo y ancho de los mismo. Adicionalmente dichos manuales indican la determinación del número de flores por axila, posición de la flor, color de la corola, forma de la corola, longitud del cáliz, color de las anteras, entre otras, para así asegurar la identificación de las variedades en estudio

#### **2.4.2 Caracterización molecular**

Las nuevas técnicas de biología molecular permiten la evaluación de diversos métodos de polimorfismo genético en el ADN. Los marcadores moleculares se definen como “cualquier diferencia controlada genéticamente” (Valadez y Kahl, 2000). Se puede considerar como un marcador, cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso. Un marcador monomórfico es aquel que es invariable en todos los organismos estudiados. Sin embargo, cuando éste presenta diferencias en cuanto a sus características, tales como, peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico.

Inicialmente, la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN que es el RFLP. Luego, el desarrollo del proceso de amplificación de la cadena utilizando ADN

polimerasa- PCR (Mullis y Faloona, 1987; Saiky et al., 1988) llevó al inicio de otros tipos de marcadores moleculares que aliados a técnicas de clonación y secuenciamiento del ADN, han posibilitado obtener y acumular gran número de información sobre el genoma. Hoy en día mediante estas técnicas se puede obtener un número ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos. Cada técnica presenta sus propias características como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8. Principales marcadores polimórficos de DNA y sus características más importantes.**

<b>Características</b>	<b>RFLP</b>	<b>SNP</b>	<b>Microsatélites</b>	<b>AFLP</b>	<b>RAPD</b>
<b>Principio</b>	Digestión con Enzimas de restricción, Southern blot e hibridación	Amplificación por PCR y secuenciamiento de sitios con variación de la base	Amplificación por PCR de secuencias repetidas simples	Digestión con Enzimas de restricción y amplificación por PCR	PCR con partidores arbitrarios.
<b>Tipo de polimorfismo</b>	Cambios de bases en sitios de restricción, inserciones y deleciones	Cambios de bases en la posición de un nucleótido, pequeñas inserciones y deleciones	Diferencias en longitud debido a número de unidades repetidas	Diferencias en longitud debido a cambios de bases en sitios de restricción	Cambios de bases en sitios de unión del partidor al templado inserciones y deleciones
<b>Polimorfismo</b>	Moderado	Alto	Alto	Moderado	Moderado a Bajo
<b>N° loci detectados</b>	1 a 3	1	1	Muchos	1 a 10
<b>Dominancia</b>	Codominante	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante
<b>Conocimiento del genoma estudiado</b>	No	Si	Si	No	No
<b>Dificultad técnica</b>	Intermedia	Intermedia	Baja	Intermedia	Intermedia
<b>Costo de desarrollo</b>	Intermedia	Alto	Alto	Alto	Bajo

FUENTE: Modificado de Cushwa y Medrano, 1996.

A la fecha, varios autores han logrado caracterizar molecularmente un gran número de variedades de *Capsicum*, como el caso de Lefevre et al., (1993) quienes utilizaron sondas de ADN para examinar fragmentos de longitud polimórficos entre cultivares de *Capsicum* y encontraron mayor variabilidad genética entre especies que entre variedades, concluyendo además que los marcadores moleculares de ADN son más informativos en estudios intraespecíficos que las isoenzimas. Algunos años después Rodríguez et al., (1999) caracterizaron 134 introducciones pertenecientes a seis especies de *Capsicum* mediante marcadores RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), identificando duplicados y permitiendo mejorar la identificación taxonómica de las introducciones.

Por otro lado, Kang et al., (2001) construyeron un mapa de ligamiento a partir de marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic DNA) y AFLP (Amplified Length Polymorphic DNA) pudiendo asignar al mapa de ligamiento los genes encargados de la biosíntesis de carotenoides y capsaicina.

El mismo año Kumar et al., (2001) utilizaron los marcadores moleculares de ADN para la defensa de la propiedad intelectual en germoplasma de *Capsicum*, al analizar muestras de semilla que estaban siendo propagadas y vendidas sin la debida autorización legal. Algunos años después Guzmán (2007) Evaluó 21 microsátélites en una población formada por 12 especies de *Capsicum* para seleccionar los mejores marcadores utilizados en la caracterización del germoplasma de este género.

La revisión bibliográfica de los últimos años apoya la decisión de incluir la caracterización molecular en el estudio de colecciones de germoplasma y en particular del género *Capsicum* (Lefebvre et al., 1993; Rodríguez et al., 1999; Sanwen et al., 2000; Kang et al., 2001 y Kumar et al., 2001). Hay muchas ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos: el alto nivel polimórfico, no son influidos por el medio ambiente, son neutros, son codominantes en su gran mayoría, contienen mayor información genética por locus, no se requiere que la planta esta adulta, se puede identificar en cualquier estadio de la planta, desde de tejidos o células (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

### **III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS COLECCIONES NACIONALES DE AJÍES**

#### **3.1. Muestras**

En Perú existen principalmente dos colecciones nacionales de *Capsicum*, una de ellas ubicada en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y la otra en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Esta última, creada a partir del proyecto denominado “Descubriendo el potencial de la diversidad de los cultivos olvidados para la diferenciación de productos de alto valor y la generación de ingresos para los agricultores de menores recursos: El caso de los Ajíes en su Centro de Origen” financiado por la GIZ y que involucro los países de Perú y Bolivia.

La colección Nacional de *Capsicum* del INIA está conformada por 413 accesiones, de las cuales 408 han sido caracterizadas molecularmente mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites. Además, estas accesiones se agruparon por especie: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *Capsicum sp.*, este último grupo no cuenta con datos de identificación taxonómica.

Por otro lado, en la Universidad Nacional Agraria La Molina se han caracterizado 110 accesiones de *C. chinense* y un grupo de 25 individuos de las 5 especies domesticadas de *Capsicum* usando marcadores moleculares AFLP.

#### **3.2. Metodología**

##### **3.2.1. Método de extracción de los Ácidos Nucleicos**

El material usado para la obtención de ADN en ambas colecciones consistió en hojas jóvenes de plántulas, procedentes del banco de germoplasma del Huerto -

UNALM y la Estación Experimental Agraria Donoso – Huaral respectivamente. Estas muestras se colectaron en papel toalla para luego ser depositadas en bolsas plásticas o simplemente depositadas en un sobre de papel, para posteriormente trasladarlas al laboratorio. El método de extracción empleado en los dos casos fue una adaptación del método CTAB (Doyle y Doyle, 1987), con el cual se obtuvieron ADN de buena calidad y concentración.

### **Cuantificación y calidad del ADN**

La concentración y calidad del ADN fue evaluada en un espectrofotómetro micro-volumenes, donde se verificó la concentración y calidad de ADN mediante lecturas a 260 nm de longitud de onda y la relación 260/280 de absorbancia, respectivamente. El ADN de las accesiones de INIA se encontró aproximadamente en el rango de 600 a 800 ng/ul de concentración de ADN para ser utilizado en el análisis con microsatélites (SSR).

Así mismo, se hizo uso del método por electroforesis en gel de agarosa al 1%, para cuantificar se utilizó un marcador Fago LAMBDA/hind II dna ladder de 100 pb. Posteriormente se realizó una dilución de ADN de cada accesión hasta alcanzar la concentración final de 50 ng/ul, que se utilizó para el análisis de AFLP de las accesiones de la UNALM. La determinación de un método u otro dependió de la disponibilidad de equipos de espectrofotometría.

### **3.2.2. Marcadores moleculares**

Las colecciones nacionales de Ajíes nativos han sido caracterizadas genéticamente mediante marcadores moleculares tipo AFLP y SSR, los cuales tienen las siguientes características:

#### **Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)**

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo inglés AFLP "Amplified fragment length polymorphism" son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles. Sin embargo, la técnica es más complicada de ejecutar que la de los RAPD y el SSR, además requieren una mayor cantidad de ADN

(Karp et al., 1997; SIDTA, 1999). Se pueden emplear, por ejemplo, en la construcción del armazón de los mapas genéticos en el que se localizan los marcadores codominantes, para discriminar entre individuos cercanamente relacionados y para localizar genes específicos en genomas complejos (Valadez y Kahl, 2000).

El análisis AFLP combina la digestión con enzimas de restricción con el PCR. El primer paso involucra la digestión del ADN con dos enzimas específicas de restricción, una de las cuales corta secuencias precisas y la otra corta más frecuentemente. Es necesario agregar adaptadores para que éstos se peguen en los bordes de los fragmentos recién formados y de esta manera proveer una secuencia conocida para poder amplificar mediante PCR. En este paso, también se requiere el uso de ligasas para facilitar la unión entre los bordes de los fragmentos y las secuencias cortas conocidas.

El uso de adaptadores es necesario porque las secuencias que quedan en los bordes de los fragmentos, luego de ser cortados, no son adecuadas para actuar como iniciadores (Karp et al. 1997). Si el primer paso se realizó adecuadamente, todos los fragmentos de restricción se amplificarían mediante PCR. Para poder discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman, se diseñan los iniciadores de tal manera que incorporen el adaptador de secuencia conocida más uno, dos o tres pares de bases (dejando por fuera alguna de las cuatro posibles: A, G, C o T).

La amplificación mediante PCR solo ocurrirá en aquellos fragmentos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para los pares de base adicionales. En este caso, los pares de bases adicionales actúan como nucleótidos electivos. Si solamente se utiliza uno de estos nucleótidos se amplificarán más fragmentos de los que se podrían amplificar si se utilizaran dos nucleótidos.

Del mismo modo, si se utilizan tres nucleótidos se obtendrían menos fragmentos amplificados. Por alguna razón técnica, la adición de más de tres nucleótidos selectivos al iniciador resulta en una amplificación PCR no específica (Karp et al. 1997). Durante la PCR normalmente se realizan dos ciclos térmicos selectivos. En el primero se utiliza un único nucleótido selectivo, en el segundo ciclo térmico, se utiliza el anterior nucleótido más uno o dos nucleótidos selectivos adicionales. Los fragmentos amplificados de esta forma pueden ser luego separados en un gel de poliacrilamida

mediante electroforesis y los productos de la amplificación pueden ser visualizados mediante fluorescencia (Karp et al. 1997).

Valadez y Kahl (2000) mencionan que los AFLPs surgen a partir de: A) Polimorfismos en los sitios de restricción, en donde una secuencia específica para el reconocimiento de una endonucleasa de restricción está presente o ausente. B) Polimorfismos en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie (“tandem”) tienen sitios variables. C) Cambios en los pares de bases de ADN no asociados con sitios de restricción.

### **Microsatélites (SSR)**

Los microsatélites o SSRs, iniciales de su nombre en inglés (Simple Sequence Repeats), son secuencias cortas de ADN, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas cierto número de veces y que se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002).

Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (Morgante y Olivieri, 1993).

Por su alta tasa de mutación este constituye el marcador molecular con un alto contenido de información polimórfica (PIC). Esta característica hace que sus aplicaciones sean en muchos campos como marcador molecular y podemos aplicarlo en: “Fingerprinting” (Wesing *et al.*, 1995; Diwan y Cregan, 1997; Ashikawa *et al.*, 1999), mapeo genético (Broun y Taksley, 1996; McCouch *et al.*, 1997; Roder *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000). Filogenética (Goldstein y Pollock, 1997), mejoramiento genético asistido y genético de poblaciones (Goldstein *et al.*, 1999).

Es una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de ADN son requeridas, son muy abundantes: los microsatélites, están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kbp. Si tenemos en cuenta la expresión codominante y el multialelismo, los SSR son los que poseen el más elevado contenido en la información de Polimorfismo, donde de todos los marcadores moleculares. Por esa razón toda población segregante pueden ser utilizadas como población de referencia para estudios

de ligamiento y mapeo genético, para seleccionar la población más informativa desde el punto de vista de las características biológicas o económicas de interés. Son muy frecuentes y están distribuidas al azar, y permite así la más completa cobertura del genoma. Y estos sitios están bien conservados entre especies relacionadas, la cual permite la transferencia de marcadores entre especies, haciéndolos ideales para el mapeo genético y discriminación de genotipos y en estudio de genética de poblaciones (Ferreira y Gatappaglia, 1998)

Dentro de las limitaciones de los microsatélites se da en el trabajo previo ya que se necesita cierta práctica para hacer el clonamiento y secuenciamiento de los loci SSR, exigiendo personal especializado y equipamiento necesario (Ferreira y Gatappaglia, 1998. Por otro lado, tenemos la aparición de alelos nulos o la presencia de alelos de bandas “tartamudas”, que se podría dar en el caso que mutaciones puntuales, ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores. Las bandas tartamudas son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. Las ocurrencias de estas bandas dificultan la lectura de los geles, e inclusive, y son confundidos como alelos, complicando el análisis posterior. Por la tanto la interpretación de los tamaños de los alelos se haga con dificultad. Esto probablemente se da por equivocación de la Taq polimerasa durante el proceso de replicación.

#### **3.2.4. Amplificación de marcadores mediante PCR**

##### **Obtención de marcadores AFLP para el análisis de las accesiones de ají de la UNALM**

Para la obtención de los marcadores AFLP, las muestras de ADN fueron cortadas con endonucleasas de restricción, (una de corte raro y otra de corte frecuente), generándose tres clases de fragmento que difieren en sus extremidades. Se utilizó EcoRI y MseI, y se ligó a adaptadores específicos. Luego se hizo una pre-amplificación de los fragmentos de ADN digeridos y ligados. Se selecciona los fragmentos que serían amplificados, donde los iniciadores utilizados no contienen nucleótidos arbitrarios adicionales. Posterior a lo cual se realizó una amplificación selectiva con tres nucleótidos selectivos de los fragmentos de DNA pre-amplificados. Los iniciadores utilizados presentaron

otros dos nucleótidos arbitrarios adicionales, con lo que la amplificación se hizo más selectiva.

La amplificación de fragmentos digeridos se llevó a cabo empleando iniciadores con secuencias complementarias a la de los adaptadores y los sitios de restricción. La especificidad de esta unión fue determinada por el número de nucleótidos selectivos que tuvieron el iniciador AFLP, pudiendo no tener desde ninguno hasta 3 nucleótidos selectivos en su extremo 3 (Vos et al.1995)

Se hizo una elección arbitraria de 8 accesiones diferentes de *Capsicum*, con la finalidad de escoger las mejores combinaciones polimórficas y bandas de mayor calidad y nitidez para facilitar el score. Con estos criterios se seleccionaron los iniciadores que se utilizaron para la evaluación de todas las accesiones.

Luego de la amplificación, los productos fueron separados con un equipo de electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y urea 5M y posteriormente fueron denaturados a 95°C por 5 min. Inmediatamente después se cargaron 5 ul de la misma, en el gel de poliacrilamida, donde el tiempo de corrida fue de 4 horas a 1600v o toda la noche 350v, según disponibilidad de equipos.

La tinción y revelado de geles se hizo siguiendo el de Bassan et al. (1991).

### **Amplificación de marcadores SSR mediante PCR**

En el caso del INIA se emplearon 14 pares de cebadores o primers para microsatélites, elegidos por su alto valor de polimorfismo (PIC) (ver Tabla 7). Para la amplificación de los microsatélites se siguieron estrategias a diferentes temperaturas de alineamiento para estandarizar las condiciones en las cuales los cebadores van a ser amplificados. En la PCR se adicionará los cebadores forward (F) con cola M13 é cebador reverse (R) sin cola M13. Asimismo, se adicionará a la PCR secuencias marcados con fluoróforos distintos: FAM, HEX y NED complementarias a la cola M13. Esta es una estrategia que nos permitirá ahorrar costos evitando sintetizar cebadores marcados con un tipo de fluoróforo, además nos permite seleccionar entre las distinto tipos de fluoróforo utilizados para el marcaje de los amplificados específicos de una región microsatélite (Schuelke, 2000). Finalmente, los productos del PCR serán visualizados por geles de agarosa al 2% antes de ser analizados mediante electroforesis capilar en el Analizador Genético.

**Tabla 9. Listado de primers microsatélites evaluados en INIA**

NOMBRE	MOTIVO	SECUENCIA	DYE	FUENTE
EPMS-603	(a)19	F CACGACGTTGTA AACGATGCTCCTTAAGACTGGCACC R GGGTTCGGCTCTGTTATTGA	Fam	Portis et al. (2007)
EPMS-643	(ct)17	F CACGACGTTGTA AACGACCCAAGATCAACTCTTACGCTAT R CCCCTCAAGAATTCCCTCCAT	Fam	Portis et al. (2007)
EPMS-650	(ta)19	F CACGACGTTGTA AACGACCATGGGTGAGGGTACATGGT R AGAGGGAAGGGTTATTGCC	Fam	Portis et al. (2007)
EPMS-709	(gag)6	F CACGACGTTGTA AACGACACGCCGAGGACTATGATGAC R TTCTTCATCCTCAGCGTGTG	Hex	Portis et al. (2007)
EPMS-924	(ct)6 (ta)9 (gta)5	F CACGACGTTGTA AACGACGCCGTCGTCAGAAAAGGTAG R TGCATTTCTGTCAGAGGCTG	Fam	Portis et al. (2007)
CAMS-163	(at)7 (gt)14	F CACGACGTTGTA AACGACTCCATATAGCCCCTGTGTGA R GCGTGGGAATACAATGCTAGA	Fam	Minamiyama et al. (2006)
CAMS-340	(ta)3 (ag)13	F CACGACGTTGTA AACGACTTTATGCCCATTCACAAAATAA R GCTCAGCAAATTGAGGAGAAG	Ned	Minamiyama et al. (2006)
CAMS-456	(tc)10	F CACGACGTTGTA AACGACATGGAGCTGGGGCTAAAAAT R GCTCAGCAAATTGAGGAGAAG	Ned	Minamiyama et al. (2006)
CAMS-644	(gt)3...(ag)23	F CACGACGTTGTA AACGACCGCATGAAGCAAATGTACCA R ACCTGCAGTTTGTTCGGTCTTTC	Fam	Minamiyama et al. (2006)
CAMS-647	(tat)6tg(tta)3 (tat)21	F CACGACGTTGTA AACGACCCGATTTCGGTTGAGTCGATA R GTGCTTTGGTTCGGTCTTTC	Fam	Minamiyama et al. (2006)
CAMS-865	(gaa)7	F CACGACGTTGTA AACGACAGAAATCGTGTTGGGTGAG R CACTTTGGCACATTTTGCTG	Fam	Minamiyama et al. (2006)
CAMS-867	(cct)3tc(tct)4 (tct)7	F CACGACGTTGTA AACGACTGTGTCTGAAGCGGAACAAA R AAGCAGTGAGCGCAAGA	Hex	Minamiyama et al. (2006)
AA840692	(t)20	F CACGACGTTGTA AACGACTGGAAGTGATTACTGGAACCATGC R GGGGTTTAGTCATGCAATCTTTGC	Ned	Lee et al. (2004)

FUENTE: Elaboración propia.

### 3.2.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos en la amplificación de los marcadores moleculares mediante PCR fueron analizados siguiendo las distintas estrategias:

#### Análisis de la caracterización molecular mediante AFLP.

##### A) Análisis de similitud

La similitud genética entre las accesiones se estimó calculando el coeficiente de similitud Simple Matchin (SM) conocido como Sokal y Mechner (1958). Para esto se utilizó el programa NTSYS pc 2.2 Sistema de análisis multivariado de taxonómica numérica (Rohlf 2000).

## **B) Análisis de agrupamiento**

Los dendogramas se elaboraron a partir de la matriz de similitud, siguiendo el algoritmo UPGMA de la opción SAHN del programa NTSYS. Se consideró que todos los marcadores obtenidos constituyeron una muestra representativa al azar de todo genoma de *Capsicum* de la población analizada.

## **C) Análisis de varianza molecular**

El programa ARLEQUIN versión 3.11 (excoffier et al.2005), permitió el análisis de varianza (AMOVA), a fin de determinar las variaciones existentes en el material evaluado. Este análisis es un método que estudia la variación molecular dentro y entre especies. En este caso con el AMOVA se evaluó primero la diversidad entre poblaciones que pertenecen a un mismo grupo o área geográfica y luego la diversidad entre individuos dentro de cada población. Es decir, se calculó la varianza genética existente entre *Capsicum* provenientes de las 3 regiones de Perú para luego comparar la variación genética existente entre los *Capsicum* de cada departamento dentro de cada una de las regiones y luego se analizó la variación existente en provincias dentro de cada departamento.

Esto se trabajó a partir de datos binarios, con los cuales se crea una matriz de distancia entre cada par de individuos, a fin de medir la estructura genética de la población de la cual ha sido tomada las muestras.

## **Análisis de la caracterización molecular mediante SSR.**

El análisis de la amplificación de los Microsatélites por PCR, se realizó mediante el Analizador Genético ABI 3130 xl, por electroforesis capilar y detección fluorescente de los amplificados. Los resultados fueron leídos por medio del Software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). Luego se estimó el contenido de índice polimórfico (PIC), mediante el software NTSYS. Así mismo, se llevó a cabo un análisis factorial de correspondencia de los datos obtenidos de los SSR mediante el software Genetix, en donde se agruparon las accesiones por especie.

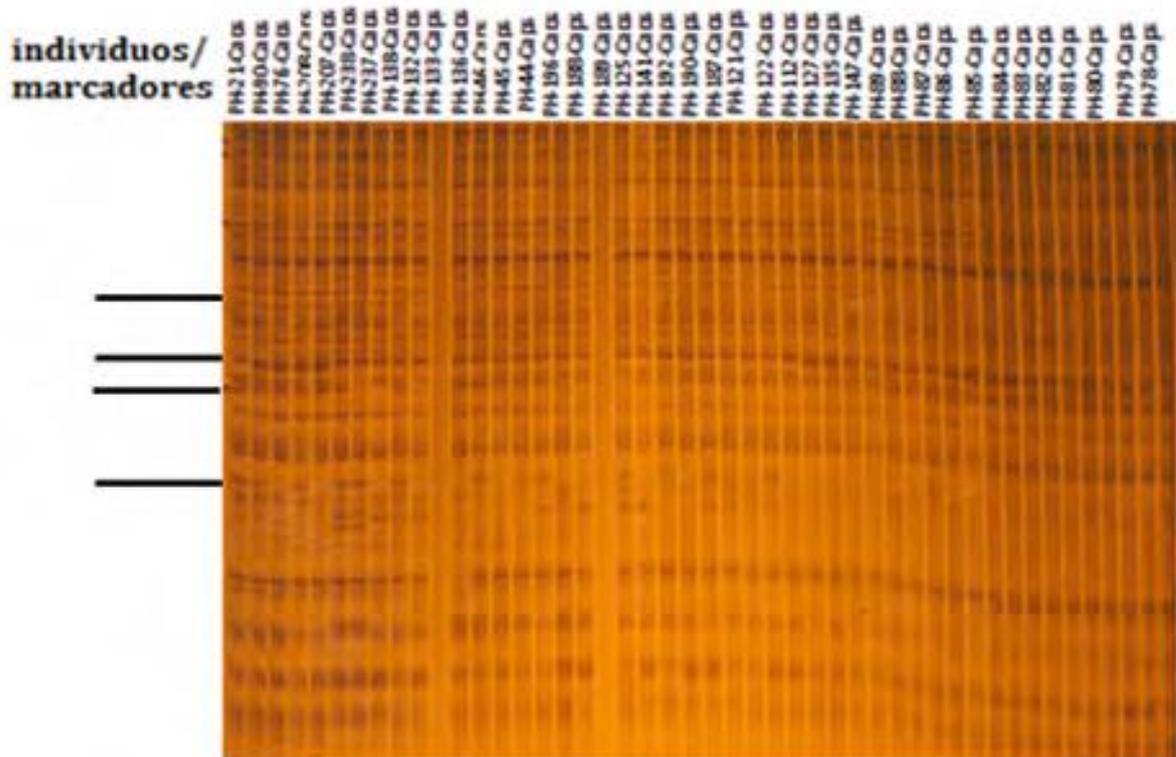
### 3.3. Resultados

#### A) Resultados obtenidos para las accesiones de ají de la UNALM mediante AFLP

##### Variabilidad genética

La combinación más informativa de las 6 evaluadas para las accesiones de *C. chinense* fue E37/M33, con un total de bandas 84 de las cuales 15 mostraron polimorfismo. En comparación con otros estudios, este número de polimorfismos es menor a lo reportado por Guzmán et al. (2005), el cual encontró 26 bandas polimórficas para un análisis de 40 accesiones de *C. annum*, pero mayor al valor obtenido por Paran et al. (1988), quien reporto un menor valor de polimorfismos en 34 genotipos de esta misma especie. Por otro lado, en el caso de la identificación de especies para *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* las combinaciones más informativas fueron E37/M32, y E33/M61 las cuales obtuvieron un alto polimorfismo.

**Figura 5. Perfil electroforético y agrupamiento de 110 individuos de la especie *C. chinense* combinación de iniciadores AFLP: E37/M33**



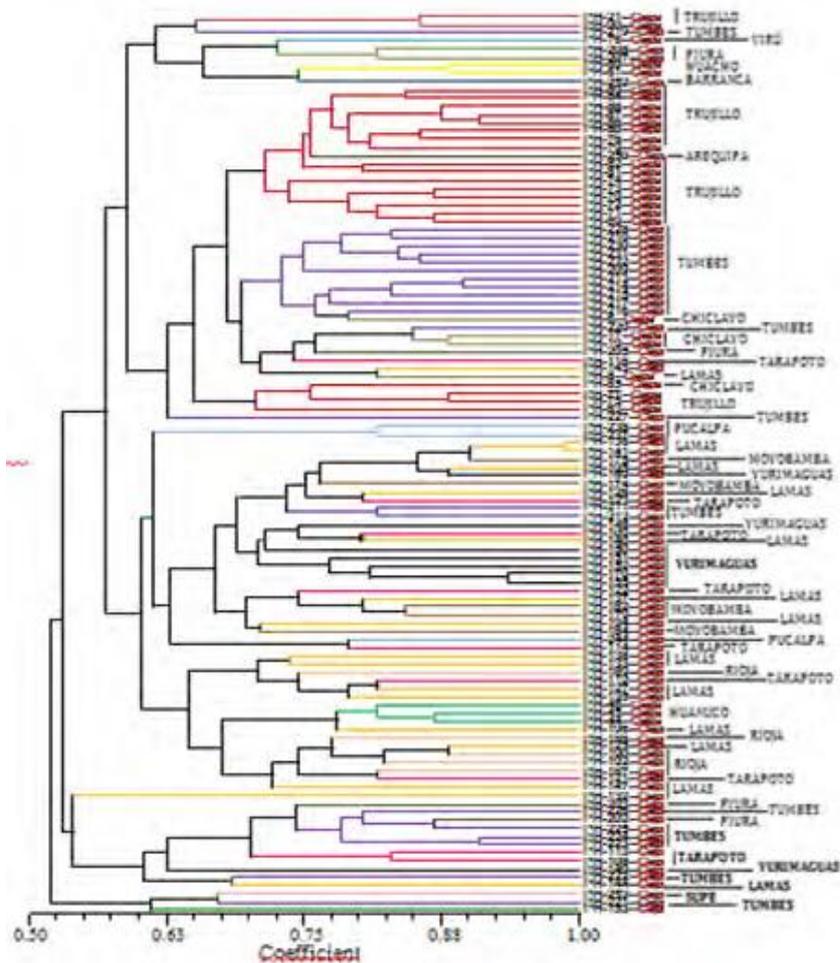
FUENTE: Corozo, 2012.

## Dendograma

Para el análisis molecular de las 110 accesiones de *C. chinense* mediante la elaboración de dendogramas se pudo observar la formación de 22 grupos los cuales no necesariamente se agrupaban por el lugar de procedencia, además se observó que cada accesión fue diferente, con lo se descartaría la presencia de duplicados.

Según el dendograma para la identificación de especies, se observan 5 grupos pertenecientes a cada una de las especies de *Capsicum* evaluados, donde se observó alto índice de similitud entre *C. annuum*, *C. chinenses* y *C. frutescens*, corroborando lo mencionado por Pickersgill (1980) al considerar estas 3 especies dentro de un cultigrupo en vías de diferenciación. Además, se observó que las accesiones de *C. baccatum* conforman grupo claramente diferenciado.

**Figura 6. Variabilidad genética de una colección de *C. chinense* del norte del Perú.**



FUENTE: Corozo, 2012.

### **Análisis de varianza molecular**

Según los resultados del AMOVA para las muestras de *C. chinense*, la mayor variabilidad genética se encontraría a nivel de las accesiones dentro de cada provincia. En cuanto a las especies cultivadas, la mayor variación se encontró entre las especies en comparación con la encontrada dentro de las accesiones pertenecientes a una misma especie, lo cual indicaría que los ajíes son cultivos que mayormente se reproducen por autopolinización (Tanksley, 1984).

### **B) Resultados obtenidos para las accesiones de ají de la INIA mediante SSR**

#### **Polimorfismo molecular**

Los resultados obtenidos en las accesiones del INIA muestran valores del índice de contenido de información polimórfico (PIC) por encima del 0,49, además 5 de los 14 primers presentaron un PIC mayor al encontrado en los artículos usados como referencia. Los microsatélites que mostraron un mayor índice polimórfico fueron el CAM-647, CAMS-163 y el EPMS-650, en los cuales se obtuvieron 14, 21 y 19 alelos respectivamente. Los cuales son altamente informativos para trabajos de caracterización molecular. Sin embargo, cabe señalar que se obtuvo un número considerable de alelos nulos para algunas accesiones (datos no mostrados), explicado por la especificidad de algunos primers que generalmente son diseñados a partir de un grupo pequeño de especies de *Capsicum* de importancia económica, las cuales cuentan con más información sobre su genoma.

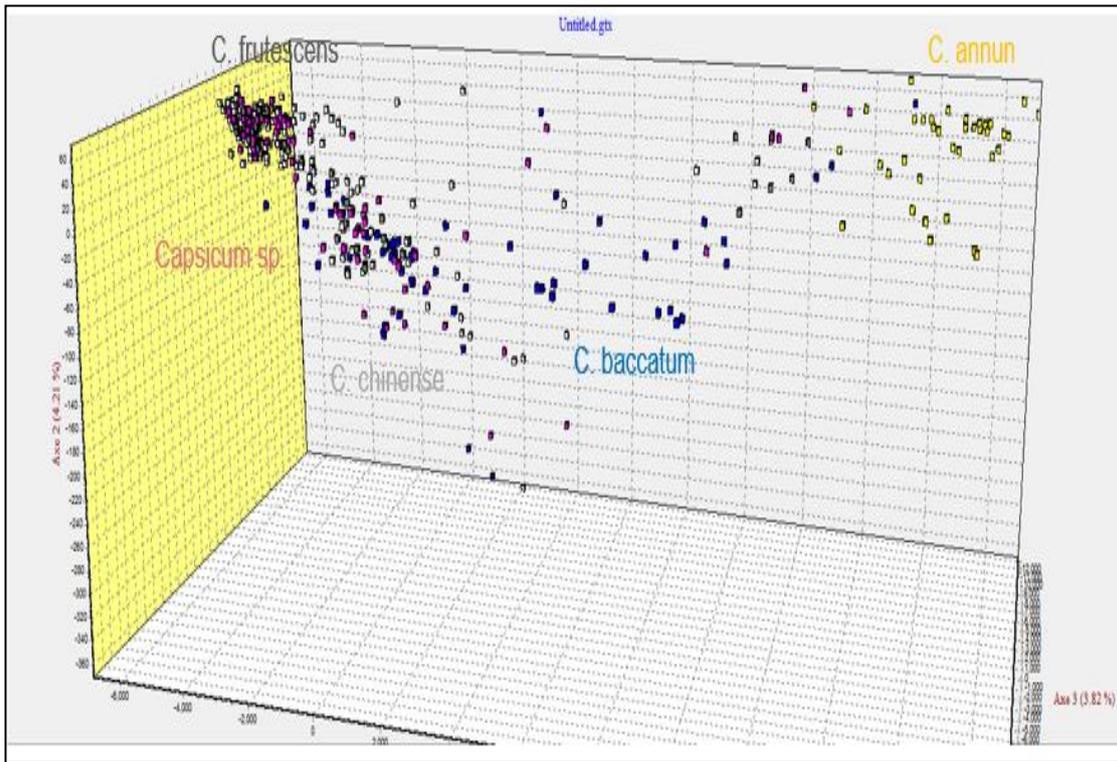
**Tabla 10. PIC de 14 primers evaluados en 408 accesiones de la Colección de Ajíes del INIA**

Primer	PIC	Número de alelos	Riqueza alelica (14 primers)	Rango	PIC articulo
AA840692_199	0.5138	3	413	199-211	0.43
CAMS- 163	0.8879	21	428	299-367	0.86
CAMS- 340	0.7680	15	423	258-288	0.82
CAMS- 420	0.8194	11	523	204-236	0.63
CAMS- 456	0.6408	5	445	161-173	0.69
CAMS- 644	0.7680	14	440	194-234	0.78
CAMS- 647	0.9014	14	462	162-194	0.95
CAMS- 865	0.6741	6	662	191-201	0.69
CAMS- 867	0.6391	7	432	261-279	0.78
EPMS- 603	0.4968	6	443	159-179	0.24
EPMS- 643	0.5848	7	423	216-240	0.82
EPMS- 650	0.8586	19	450	240-299	0.86
EPMS- 709	0.8166	14	484	261-303	0.79
EPMS- 924	0.7626	15	433	284-318	0.82

FUENTE: Boletín informativo número 7 – Proyecto *Capsicum*, 2013.

### **Análisis factorial de correspondencia (AFC)**

En el análisis factorial de correspondencia (AFC) de los alelos obtenidos con los SSR para las 408 accesiones de ají del INIA, se pudo observar las agrupaciones de las accesiones de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y un último grupo sin identificación taxonómica. Encontrándose una relación estrecha entre las especies de *C. chinense* y *C. frutescens*, así como accesiones que se localizaron en grupos de especies diferentes a los de su clasificación taxonómica, lo cual podría deberse a la cruzabilidad en las especies de ají dentro del banco de germoplasma. Además, este análisis mostraría que la mayoría de las especies sin clasificación taxonómica se encontraría en su mayoría dentro del grupo de *C. chinense*, *C. frutescens*. Por otro lado, observamos un distanciamiento del grupo de las muestras de *C. annuum* lo cual contradice lo expresado por Pickersgill (1980).



**Figura 7. Análisis factorial de correspondencia de las accesiones de ají del INIA agrupados por especie.**

FUENTE: Elaboración propia.

#### IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en los estudios realizados en las colecciones de ajíes de la Universidad Agraria La Molina y el Instituto Nacional de Innovación Agraria pueden ser tomados como base de futuros trabajos de caracterización molecular que incluyan más especies y entradas por especie, con el fin de encontrar más marcadores que permitan tener un conocimiento más amplio de la diversidad genética del género *Capsicum*.

Los resultados obtenidos por los marcadores moleculares AFLP y SSR en las colecciones nacionales de ají, proporcionan un marco para la gestión de germoplasma, sirven como guía para futuros bancos de germoplasma y son imprescindibles para la conformación de colecciones núcleo que minimizarían los gastos en el mantenimiento de las colecciones. Sin embargo, los microsatélites (SSR) evaluados por INIA mostraron ser más informativos (polimórficos) frente a los AFLP. A pesar de ello, el trabajo de caracterización llevado a cabo en la UNALM llegó a proporcionar más información, debido a la mayor cantidad de análisis que se realizaron a partir de los datos obtenidos con los AFLP.

A pesar de los avances en la caracterización molecular de las instituciones anteriormente mencionadas, aún falta seguir con esta actividad debido a los distintos enfoques que se eligieron. El INIA debe continuar analizando la información obtenida, por medio de otras herramientas estadísticas, incluir datos de caracterización molecular de la especie *C. pubescens*, y terminar de identificar taxonómicamente todas sus accesiones. Para el caso de la UNALM, se debe continuar con la búsqueda de marcadores más polimórficos y aumentar el número de accesiones de otras especies. Por ende, a fin de no duplicar esfuerzos en la caracterización molecular de los *Capsicum* es imprescindible la coordinación entre estas instituciones que presentan colecciones de este valioso recurso.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrews, J. 1995. *Peppers: The Domesticated Capsicums, New Edition*. Austin, TX: University of Texas Press.
2. Ashikawa, I; Kurata, N; Saji, S; Umehara, Y; Sasaki, T. 1999. Application of restriction fragment fingerprinting with a rice microsatellite sequence to assembling rice YAC clones *Genome/Génome* 42(2): 330-337.
3. Bassam, B.J; Caetano-Anolle's, G. & Gresshoff, PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80–83 (1991).
4. Brack, E. 2003. *Perú: 10 mil años de domesticación*. Lima- Perú: Bruño.160 pp.
5. Bosland, PW. and Votava, EJ. 2000. *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*. CABI Publishing, Wallingford, UK., pp: 1-16.
6. Boletín informativo número 7, abril de 2013. Proyecto *Capsicum*.
7. Broun, P; Tanksley, SD. 1996. Characterization and mapping of simple repeat sequences in tomato genome. *Mol. Gen. Genetic.*250: 39-49.
8. Byrne M; Marquez-García MI; Uren, T; Smith DS; Moran, GF. 1996. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany* 44: 331–341

9. Cabieses, F. 2000. Ministerio de Salud. Antropología del Ají. Lima.
10. Cañizares, J; Nuez, F. 2011. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*: 1-12.
11. Castañón, NG; Latournerie, ML; Mendoza, EM; Vargas, LA; Cárdenas, MH. 2008. Colección y caracterización de Chile (*Capsicum* spp) en Tabasco, México. *Phyton Journal International of Experimental Botany*. 77: 189-202.
12. Corozo, L. 2012. Variabilidad genética de una colección de *Capsicum chinense* Jacq. del norte del Perú. Tesis para obtener el título de Master of Science en Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
13. Correa, A. 2008. Application of simple sequence repeat (SSR) markers for genotype differentiation of 24 cassava (*Manihot esculenta* Crantz) accesions. Tesis para obtener el título de Master of Science en Biología. Universidad de Puerto Rico.
14. Cherian, EV; Indira, P. 2003. Variability in *Capsicum chinense* Jacq. Germoplasm. *Capsicum and Eggplant Newsletter*. 22: 47-53.
15. Cushwa, WT. & Medrano, JF. 1996. Applications of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species, *Animal Biotechnology*, 7:1, 11-31.
16. Dow, B; Ashley, MV. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615-627.
17. Debouck, D. y Libreros, D. 1993. Salsa picante o una breve historia del ají *Capsicum* en Colombia. V Seminario sobre recursos vegetales promisorios (memorias). Sede Vol. 1. Palmira, Universidad Nacional. 155-174pp.

18. Diwan, N. and Cregan, PB. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet* 95:723-733.
19. Doyle, JJ; DOYLE, JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15.
20. Excoffier, L; Laval, G; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47–50.
21. Eshbaugh, WH. 1977. *A Numerical Taxonomic and Cytogenetic Study of the Genus Capsicum*. Indiana University. 112 p.
22. Eshbaugh, WH. 1980. Chili peppers in Bolivia *Plant Genetics Resources – Newsletter* 43, 17-19.
23. Ferreira, ME. y Grattapaglia, D. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. pp 220.
24. Gil Ortega, R. 1990. *Resistencia a *Phytophthora capsici* León*. En *Pimiento*. Tesis Doctoral. INIA (España) – Madrid. 369 p.
25. Goldstein DB, Pollock DD (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J Hered* 88:335–342.
26. Goldstein, DB; Roemer, GW; Smith, DA; Reich, DE; Bergman, A; Wayne, RK. 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics* 151: 797-801.

27. Guzmán, FA. 2007. Desarrollo de una herramienta molecular para el estudio de la diversidad genética de germoplasma del género *Capsicum*. Tesis para obtener el título de Magister en Biología. Universidad del Valle, Colombia.
28. Ibiza, VP; Blanca, J; Cañizares, J; Nuez, F. 2001 Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean región. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59: 1077-1088.
29. INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES (IBPGR). 1983. Genetic Resources of *Capsicum*. Roma, 49 p.
30. IPGRI, AVRDC & CATIE. 1995. Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum spp.*). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación sobre Hortalizas, Taipei, Taiwan; y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 51 pp.
31. Jensen, RJ; McLeod, MJ; Eshbaugh, WH. and Guttman, SI. 1979. Numerical Taxonomic Analyses of Allozymic Variation in *Capsicum* (Solanaceae) *Taxon* 28 (4): 315 – 327.
32. Kang, B. *et al.* 2001. A interspecific (*Capsicum annuum* X *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers, *Theor. Appl. Genet.*, 102, 531-539.
33. Karp, A; Kresovich, S; Bhat, KV; Ayad, WG. and Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
34. Kumar, LD; Kathirvel, M; Rao, GV; Nagaraju, J. 2001. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annuum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Sci Int* 116:63-68.

35. Latournerie ML; Chávez, L; Pérez, M; Castañón, G; Rodríguez, SA; Arias, LM; Ramírez, P. 2002. Valoración in situ de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán, México. *Rev. Fitotecnia Méx.* 25: 25-33.
36. Lee, JM; Nahm, SH; Kim, YM; Kim, BD. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Applied Genet.*, 108: 619-627.
37. Lefebvre, V; Palloix, A; Rives, M. 1993. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 71: 189–199.
38. Liu, BH. 1998. *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. 611 p. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
39. McCouch, SR; Chen, X; Panaud, O; Temnykh, S; Xu, Y; Cho, YG; Huang, N; Ishii, T. and Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Bol.* 35: 89-99.
40. Medina, CI; Lobo, M; Gómez, AF. 2006. Variabilidad fenotípica en poblaciones de ají y pimentón de la colección colombiana del género *Capiscum*. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 7: 25-39.
41. Nuez, F; Gil Ortega, R; Costa, J. 1996. *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Ediciones Mundi-Prensa Madrid-España. 586 p
42. Minamiyama, Y; Tsuru, M; Kubo, T; Hirai, M. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breed.* 18: 157–169.

43. Minamiyama, Y; Tsuru, M; Kubo, T; Hirai, M. 2007. QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breed Sci* 57:129-134.
44. Morgante, M; Olivieri AM. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175–182.
45. Mullis, K. y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol.* 155:335-350.
46. Muñoz, M. 2002. Estudio de cruzabilidad entre las especies cultivadas y silvestres de *Capsicum annum* L. *Capsicum chinense* Jacq. y *C. frutescens* L. y propuesta de un protocolo para la observación de cromosomas en especies del género *Capsicum*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 120 p.
47. Ortiz, R. 1983. Utilización de descriptores en la caracterización de líneas de *Capsicum*. UNA.
48. Ortiz, JM; Aguinagalde, I; Martín, JP. 2000. Identificación varietal. p. 515-560. In. F. Nuez y J. M. Carrillo (eds.). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Editorial de la UVP, Valencia, España.
49. Pardey RC; García, DMA; Vallejo, CFA. 2006. Caracterización morfológica de cien introducciones de *Capsicum* del Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. *Acta Agronómica* 55: 1-8.
50. Phillips, W; Rodríguez, H; Fritz, P. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.

51. Pickersgill, B. 1969. The domestication of chili peppers: In: Ucko P. J., and G. W. Dimbley (eds). *The Domestication and Exploration of Plants and Animals*. Duckworth, London. pp: 443-450.
52. Portis, E, Nagy, L; Sasvari, Z; Stigel, A; Barchi, L; Lanteri, S. 2007. The design of *Capsicum* spp. SSR assay via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Sci*. 172: 640-648.
53. Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In: Moss, J. P. ed. *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.
54. Rallo, P; Belaj, A; De La Rosa, R; Trujillo, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Disponible en:  
[http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojunio\\_2000/almazara/almazara1.htm](http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojunio_2000/almazara/almazara1.htm)
55. Röder, MS; Korzun, V; Wendehake, K; Plaschke, J; Tixier, MH; Leroy, P; Ganal, MW. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
56. Rodriguez, JM; Berke, T; Engle, L; Nienhuis, J. 1999. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 99:147-156.
57. Rohlf, FJ. 2000. Phylogenetic models and reticulations. *Journal of Classification*, 17:185-189.
58. Saiki, RK; Gelfand, DH; Stoffel, S; Scharf, SJ; Higuchi, R; Horn, GT; Mullis, KB; Erlich, HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
59. Sanwen, H; Baoxi, Z; Milbourne, D; Cardle, L; et al. 2000. Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica* 117: 163-167.

60. Schuelke, M. 2000. An Economic Method for the Fluorescent Labelling of PCR Fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.
61. Sinha, NP. 1950. The somatic chromosomes and meiosis in *Capsicum*. *Indian J. Genet.* 10: 36-42.
62. SIDTA. 1999. Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Disponible en:  
<http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>
63. SOKAL, RR. and CD. MICHENER, CD. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.*, 38: 1409-143.
64. Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.
65. Tanksley, SD. 1984. Linkage relationships and chromosomal locations of enzymes coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma* 89:352-360.
66. Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471.
67. Valadez y Kahl (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Mundi-Prensa México.
68. Van Zonneveld, M; Ramirez, M; Williams, DE; Petz, M; Meckelmann, S; Avila, T; et al. 2015. Screening Genetic Resources of *Capsicum* Peppers in Their Primary Center of Diversity in Bolivia and Peru. *PLoS ONE* 10(9): e0134663.

69. Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van de Lee, T; Hornes, M; Freijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 21, 4407-4414.
70. Walsh, BM. and Hoot, SB. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two non-coding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. *Int. J. Pl. Sci.* 162: 1409–1418.
71. Wang, D. and Bosland, PW. 2006. The genes of Capsicum. *HortSci.*, 41: 1169-1187.
72. Weising, K; Atkinson, R; Gardner, RC. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primerd PCR: a critical evaluation. *PCR Methods and Applications*, Vol 4, 249-255.
73. Williams, DW; Rios Lobo, LI; Van Zonneveld, M. 2011. La colección nacional de Capsicum respalda el aprovechamiento de ajíes en el Perú IN VIII. Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Quito (Ecuador), 21-23 Nov 2011-Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Ecuador)-3 p.
74. Yu, K; Park, J; Poysa, V; Gepts, P. 2000. Integration of Simple Sequence Repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Hered* 91:429-434.
75. Zapata, M; Bañon, S; Cabrera, P. 1992. El pimiento para pimentón. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España pp. 30- 42.
76. Zane, L; Bargelloni, L. and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11: 1–16.