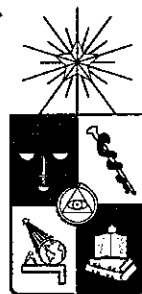


UCH-FC
MAG-B
S112
C-1



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



“Mapeo de loci de rasgos cuantitativos controlando la resistencia a *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum*: estudios moleculares y fisiológicos.”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Por

Javier Alexis Saavedra Romero

Directora de Tesis: Dra. Liliana Cardemil O.

Co-Directora de Tesis: Dra. María Teresa Pino Q

Septiembre, 2015

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

JAVIER ALEXIS SAAVEDRA ROMERO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Septiembre de 2015.

Director de Tesis

Dra. Liliana Cardemil O

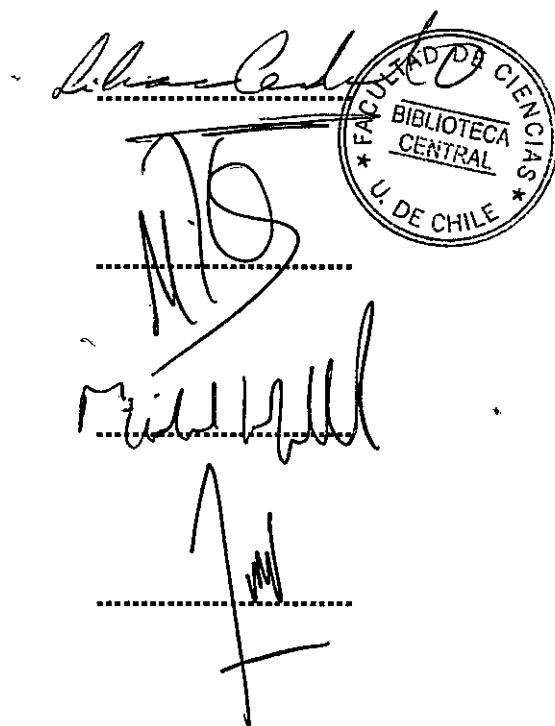
Co-Director de Tesis

Dra. María Teresa Pino Q

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Michael Handford

Dr. Claudio Pastenes



The right side of the document features three handwritten signatures, each positioned above a horizontal dotted line. The top signature is in cursive and appears to be 'Liliana Cardemil O'. The middle signature is more stylized and appears to be 'María Teresa Pino Q'. The bottom signature is also stylized and appears to be 'Michael Handford'. To the right of these signatures is a circular stamp with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS', 'BIBLIOTECA CENTRAL', and 'U. DE CHILE' around the perimeter, with a star on each side. The stamp is partially overlapping the top signature.

“Esta tesis fue financiada por el programa de Formación de Capital Humano Avanzado de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) del Gobierno de Chile mediante la beca de Magíster Nacional folio N° 22121448 y el Proyecto INNOVA CORFO 09PMG-7244.”

A toda mi familia, a todos mi amigos y a cada uno que me entregó parte de su energía positiva. Y a ti Hita, por ser quien eres y quererme tal como soy.

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia quienes, desde el primero momento en que decidí dar este paso, estuvieron alentándome y apoyándome en todo lo que significa salir de mi ciudad para emprender nuevos desafíos.

Quiero agradecer también a mis dos profesoras guías, profe Liliana y profe María Teresa, quienes me acogieron en sus respectivos grupos de trabajo, me guiaron, criticaron y compartieron conmigo sus experiencias y conocimientos, el cual es el mayor legado que pueden entregar a sus alumnos. Gracias de todo corazón a ambas.

De manera muy especial, deseo agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Fisiología y Genética Hortícola e INIA en general. A los actuales (Francisca, Olga, Andrea, Susi, Karen, Cristina, Pancho, Dani, Cristian, Lucho, Alan, Gabriel, Mabel, Gloria, don Luis) y a todos quienes han pasado, ya sea trabajando, realizando tesis y prácticas. Gracias por su apoyo, amistad y alegría que compartimos diariamente.

Además, extender mis agradecimientos a Paulina Sepúlveda y su grupo de trabajo del Laboratorio de Fitopatología de INIA La Platina, por su constante colaboración en este trabajo.

Muchas gracias a todos los integrantes (profesores, técnicos y alumnos) del Centro de Biología Molecular Vegetal, por sus críticas valiosas en los seminarios grupales y su colaboración cada vez que tuve la oportunidad de trabajar en el laboratorio.

Al equipo de voleibol de la facultad de Ciencias, por acompañarme con su amistad y compañerismo en todo este proceso y compartir juntos una de las pasiones más importantes de mi vida. Sin duda, el voleibol nos mantendrá unidos por mucho tiempo más =).

Casi terminando esta inagotable lista, quiero agradecer a todos mis amigos de infancia, con los cuales he recorrido la mayor parte de mi vida... sin su amistad y cariño, el camino hubiese sido sin lugar a dudas, bastante más complicado.

Y para terminar, agradecer a dos hermosas compañeras, con quienes, en conjunto, hemos aprendido a aceptarnos, apoyarnos, comprendernos y avanzar todos los días en el crecimiento personal. Gracias Maite =) por convertirme en un ser peludo que llegó a alegrar mi vida. Espero que sientas lo mismo de parte de nosotros. Y gracias Hita, que sin tu empuje, tu fuerza interior, amor y amistad, nada de esto posiblemente hubiese sido cierto. Llegamos juntos y terminamos juntos. Con todo mi corazón, quiero darte las gracias.

La lista es enorme, y probablemente muchos han quedado en el tintero, pero estos agradecimientos van para todos quienes hicieron de este caminar, un proceso provechoso y lleno de aprendizaje.

Índice General

Índice General.....	vi
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>El género Capsicum</i>	1
1.1.1 Origen, domesticación y distribución.....	1
1.1.2 Taxonomía y Genética	3
1.2 <i>El pimiento (Capsicum annuum var. annuum)</i>	5
1.2.1 Aspectos botánicos.....	5
1.2.2 Estadísticas productivas del pimiento	7
1.2.2.1 Situación del cultivo del pimiento en el mundo	7
1.2.2.2 Situación del cultivo del pimiento en Chile	9
1.2.3 Limitantes sanitarias en la producción del pimiento	12
1.2.3.1 Patógenos asociados al cultivo	12
1.2.3.2 <i>Phytophthora capsici</i> L., el patógeno más relevante en el cultivo del pimiento	13
1.3 <i>Mapas de ligamiento genético en Capsicum</i>	14
1.4 <i>QTLs asociados a resistencia a P. capsici</i>	16
1.5 <i>Efectos del estrés biótico sobre la eficiencia fotosintética, intercambio gaseoso y estado Redox de las plantas</i>	18
1.5.1 Efectos del estrés biótico sobre la eficiencia fotosintética del PSII y el contenido de clorofila	18
1.5.2 Efectos del estrés biótico sobre el intercambio gaseoso de la hoja.....	20
1.5.3 Efectos del estrés biótico sobre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) ...	22
1.6 <i>Hipótesis</i>	24
1.7 <i>Objetivo general</i>	24
1.8 <i>Objetivos específicos</i>	24
2 MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 <i>Divergencia genética en 57 accesiones de Capsicum annuum</i>	25
2.1.1 Selección del material vegetal.....	25

2.1.2	Extracción de ADN.....	26
2.1.3	Condiciones de PCR y prueba de polimorfismo de partidores microsatélites	27
2.1.4	Determinación de distancias genéticas entre accesiones	28
2.1.5	Selección del mejor método de agrupamiento para construcción del dendrograma de divergencia genética.....	28
2.2	<i>Evaluación del efectos de la infección por P. capsici sobre la eficiencia del PSII, intercambio gaseoso y producción de EROs para selección parental</i>	29
2.2.1	Material vegetal	29
2.2.2	Preparación del inóculo.....	29
2.2.3	Método de inoculación	30
2.2.4	Diseño experimental para evaluación de parámetros fisiológicos.....	31
2.2.5	Medición de la eficiencia fotosintética del PSII.....	32
2.2.6	Cuantificación de clorofilas totales	33
2.2.7	Medición de la asimilación de CO ₂ (A _n) y conductancia estomática (g _s)	33
2.2.8	Diseño experimental para evaluación de producción de EROs (H ₂ O ₂) y daño lipoperoxidativo	35
2.2.9	Análisis de componentes principales entre variables	36
2.3	<i>Mapeo de QTLs en población segregante F₂.....</i>	36
2.3.1	Población de mapeo, Inoculación y fenotipado.	36
2.3.2	Genotipado de población F ₂	37
2.3.2.1	Amplificación de las regiones ISSR	37
2.3.2.2	Amplificación de las regiones RAPD	38
2.3.2.3	Amplificación de regiones SSR.....	39
2.3.3	Construcción de mapa de ligamiento.....	39
2.3.4	Modelamiento estadístico de la asociación fenotipo-marcador.....	39
3	RESULTADOS	41
3.1	<i>Divergencia genética en 57 accesiones de Capsicum annuum</i>	41
3.1.1	Condiciones de PCR y prueba de polimorfismo de partidores SSR	41
3.1.2	Selección del mejor método de agrupamiento	42
3.1.3	Construcción del dendrograma de relaciones genéticas entre 57 accesiones de C. annuum ..	43
3.2	<i>Análisis visual del daño y variables fisiológicas evaluadas en genotipos parentales de población de mapeo F₂.....</i>	44
3.2.1	Evaluación visual del daño	44
3.2.2	Evaluación de eficiencia fotosintética, clorofilas totales, intercambio gaseoso, H ₂ O ₂ y MDA..	44
3.2.2.1	Eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII)	44
3.2.2.2	Cuantificación de clorofilas totales.....	46
3.2.2.3	Asimilación de CO ₂ (A _n).....	47
3.2.2.4	Conductancia estomática (g _s).....	48
3.2.2.5	Cuantificación de peróxido de hidrógeno	49

3.2.2.6	Daño lipoperoxidativo	51
3.2.3	Análisis de componentes principales (ACP)	52
3.3	<i>Mapeo de loci de rasgos cuantitativos en población F₂</i>	53
3.3.1	Distribución de los individuos de la F ₂ a través del daño generado al día 14 post-inoculación	54
3.3.2	Cuantificación alélica y filtrado de marcadores para construcción de mapa de ligamiento	54
3.3.3	Construcción del mapa de ligamiento genético	55
3.3.4	Mapeo de QTLs.....	57
3.3.4.1	Método de regresión lineal simple	57
3.3.4.2	Método de Mapeo por Intervalo Compuesto (MIC).....	58
4	DISCUSIÓN	60
4.1	<i>Análisis de divergencia genética entre 57 accesiones de C. annuum</i>	60
4.2	<i>Las variables fisiológicas analizadas presentan una alta intercorrelación</i>	62
4.2.1	La resistencia y susceptibilidad a <i>P. capsici</i> se vieron directamente relacionadas a procesos de cierre estomático y asimilación de CO ₂	63
4.2.2	Genotipos susceptibles muestran una disminución de la eficiencia fotosintética del PSII, contenido de clorofila y una acumulación de H ₂ O ₂ , en contraste a lo mostrado por genotipos resistentes	64
4.3	<i>El mapa genético construido presentó 14 grupos de ligamiento</i>	68
4.4	<i>Un QTL con alta probabilidad de ligamiento fue detectado en el GL número 1</i>	70
5	CONCLUSIONES	72
6	BIBLIOGRAFÍA	73
7	ANEXOS	83

Índice de Tablas

Tabla I Taxonomía del género <i>Capsicum</i>	3
Tabla II Exportaciones chilenas de pimientos procesados para las temporadas 2011 y 2012 ..	10
Tabla III Tabla adaptada de Baron y col. (2012), describiendo los efectos de varios agentes de estrés biótico sobre parámetros fotosintéticos, intercambio gaseoso y efectos foliares	20
Tabla IV Genotipos de <i>C. annuum</i> utilizados en este estudio y el tipo cuyo fenotipo representa	25
Tabla V PCR Touchdown realizada para la amplificación de los SSR	27
Tabla VI Secuencia de partidores tipo ISSR utilizados para la construcción del mapa de ligamiento	37
Tabla VII Secuencia de partidores tipo RAPD utilizados para la construcción del mapa de ligamiento	38
Tabla VIII Detalle de los SSR amplificados para el análisis de divergencia genética	41
Tabla IX Tabla de pesos de las variables dentro de cada componente	53
Tabla X Resumen de la amplificación de los marcadores para la construcción del mapa de ligamiento en población F ₂	55
Tabla XI Resumen estadístico del método de regresión simple para mapeo de QTL.....	57

Índice de Figuras

Figura 1 Posibles relaciones evolutivas de especies del género <i>Capsicum</i> , basado en estudios de cariotipos.....	4
Figura 2 Posición filogenética del complejo <i>C. annuum</i>	5
Figura 3 Morfología de planta y principales órganos de pimiento.	6
Figura 4 Principales países productores de ají y pimiento verde al año 2013	7
Figura 5 Principales países productores de ají y pimiento deshidratado al año 2013.	8
Figura 6 Tendencias mundiales de rendimiento, área de cultivo y producción de pimientos y ajíes.....	9
Figura 7 Estimación de superficie plantada de pimiento a nivel nacional para los años 2010 al 2014 en Chile.	10
Figura 8 Rendimiento unitario de pimiento por región.	11
Figura 9 Superficie Nacional Regada de Pimiento, por método de riego (%).	12
Figura 10 Síntomas y signos producidos por la infección de <i>P. capsici</i> en plantas de <i>C. annuum</i>	14
Figura 11 Región QTL Phyto 5.2 detectada por Quirin y col. (2005). La región se ubica en el cromosoma 5 de <i>C. annuum</i>	17
Figura 12 Micelio de <i>P. capsici</i> después de 12 días de crecimiento	30
Figura 13 Procedimiento de inoculación con micelio activo en el cuello de la planta	31
Figura 14 Diseño experimental para la evaluación de fluorescencia de clorofila, intercambio gaseoso, cuantificación de clorofila, EROs y MDA.....	32
Figura 15 Procedimientos de medición con analizador de gases infrarrojo (IRGA, modelo Licor 6400X) y fluorómetro de pulso modulado (FMS2 de Hansatech).....	34
Figura 16 Test de polimorfismo de loci SSR para su selección en estudio de divergencia genética.....	41
Figura 17 Coeficientes de correlación cofenética (CCC) para dos métodos de agrupamiento en 57 accesiones de <i>C. annuum</i>	43
Figura 18 Eficiencia fotoquímica del PSII de los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación.	45
Figura 19 Contenido de clorofilas totales en los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación.	47

Figura 20 Fotosíntesis medida como la asimilación neta de CO ₂ de los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación.....	48
Figura 21 Conductancia estomática de los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación.....	49
Figura 22 Contenido de peróxido de hidrógeno en los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 4 tiempos posteriores a la inoculación, expresado como μmol de H ₂ O ₂ por gramo de peso fresco.....	50
Figura 23 Contenido de malondialdehído (MDA) en los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 4 tiempos posteriores a la inoculación, expresado como nmol de MDA por gramo de peso fresco.....	52
Figura 24 Gráfico biplot resultante del análisis de componentes principales para las variables fisiológicas y daño visual en los genotipos resistentes y susceptibles evaluados como potenciales parentales de una población de mapeo genético.....	52
Figura 25 Distribución de los individuos de la población de mapeo F ₂ a través de los diferentes niveles de daño al día 14 post-inoculación.....	54
Figura 26 Mapa genético construido en base a marcadores dominantes (ISSR y RAPD) y codominantes (SSR).....	56
Figura 27 Modelamiento de la probabilidad de ligamiento entre regiones cromosómicas y resistencia a <i>P. capsici</i> a través de los 14 grupos de ligamiento construidos.....	58
Figura 28 Detalle de una región QTL del grupo de ligamiento 1 mapeada en este estudio.	59
Figura 29 Dendrograma generado en base a la distancia genética de Yao, utilizando el método de agrupamiento NJ.....	83
Figura 30 Niveles de daño producido por la inoculación por <i>P. capsici</i> (conocido comúnmente como marchitez o tristeza del pimiento) en los cuatro genotipos a través de 4 tiempos de medición.....	84

Lista de Abreviaturas

- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- A_n : Asimilación de CO_2
- CCC : Coeficiente de Correlación Cofenética
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- EROs : Especies Reactivas de Oxígeno
- F_m : Fluorescencia máxima
- F_o : Fluorescencia mínima
- F_v : Fluorescencia variable
- F_v/F_m : Eficiencia fotosintética del PSII
- GL : Grupo(s) de ligamiento
- g_s : Conductancia estomática
- ISSR : Secuencias entre microsatélites
- LOD : Logaritmo de probabilidad
- MDA : Malondialdehído
- nm : nanómetro
- PCR : Reacción en cadena de la polimerasa
- PDA : Agar-papa dextrosa
- ppm : Partes por millón
- PSII : Fotosistema II
- QTL : Loci de rasgos cuantitativos
- RAPD : Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar
- RNAsa : Ribonucleasa
- SSR : Microsatélite
- μ L : microlitro

RESUMEN

El mapeo de loci de rasgos cuantitativos (mapeo de QTL) se ha convertido en una herramienta importante para la identificación de regiones genómicas que controlan características complejas (también conocidas como rasgos poligénicos). Además, el mapeo de QTL ha sido utilizado para aumentar la comprensión respecto a la regulación, heredabilidad y utilización de estas características en programas de mejoramiento genético.

El objetivo de este estudio fue identificar regiones génicas controlando la resistencia a *Phytophthora capsici* en una población F_2 proveniente del cruzamiento entre dos genotipos contrastantes para la resistencia en *Capsicum annuum*. Para ello se usaron 4 parentales, 2 resistentes (RESISTANT y PHYTOSUN) y 2 susceptibles (PIM 677 y FINITA), los cuales se evaluaron genética y fisiológicamente a fin de determinar el par más contrastante. Los resultados de divergencia genética mostraron que los genotipos susceptibles y resistentes fueron agrupados dentro de tres diferentes grupos genéticos. Desde el punto de vista del desempeño fisiológico, los genotipos resistentes mostraron un menor daño visual y una capacidad mayor de asimilación de CO_2 , conductancia estomática, eficiencia del PSII y eliminación de especies reactivas de oxígeno, respuestas opuestas a lo mostrado por genotipos susceptibles. Basado en estos resultados, se seleccionaron los parentales FINITA y PHYTOSUN para generar la población de mapeo F_2 . La población F_2 se genotipó usando marcadores moleculares SSR, RAPD e ISSR y se evaluó fenotípicamente post inoculación. El mapa genético se compuso de 158 marcadores moleculares distribuidos a través de 14 grupos de ligamiento (GL), los cuales promediaron una distancia genética de 15,5 cM entre marcadores. Usando la metodología de mapeo por intervalo

compuesto, se identificó una región QTL en el GL 1 altamente relacionada con la resistencia, con un valor LOD=10, conteniendo los marcadores ISSR-811-350, ISSR-836-280 y HPMS-2-21 y extendiéndose por 49 cM, entre las distancias 10 y 59 del GL 1. Este resultado indica la posibilidad de utilizar metodologías de selección asistida por marcadores para resistencia a *P. capsici* en el programa de mejoramiento genético de pimiento de INIA.

ABSTRACT

Quantitative trait loci mapping (QTL mapping) has become an important tool for the identification of genomic regions controlling complex traits (also known as polygenic traits). In addition, QTL mapping has been used to increase the understanding respect to the regulation, heritability and use of these traits in plant breeding programs.

The aim of this work was to identify genomic regions controlling the resistance to *Phytophthora capsici* in a F_2 *Capsicum annuum* population derived from the cross between contrasting genotypes for *Phytophthora capsici*. Four potential parental lines, two resistant (RESISTANT and PHYTOSUN) and two susceptibles (PIM 677 y FINITA), were used, which were genetically and physiologically evaluated to determine the most contrasting pair. Genetic divergence results showed that susceptible and resistant genotypes were clustered in three different groups. From a physiological point of view, the resistant genotypes showed less visual damage and higher CO_2 assimilation rate, stomatal conductance, the quantum efficiency (F_v/F_m), and reactive oxygen species scavenging, opposite responses were observed in the susceptible genotypes. Based on these results, genotypes FINITA and PHYTOSUN were selected to generate the F_2 population mapping. The F_2 population was genotyped using SSR, RAPD and ISSR molecular markers and phenotypically evaluated post-inoculation. The genetic map was composed by 158 molecular markers distributed across 14 linkage groups (LG), at an average marker distance of 15.5 cM between markers. Using the Composite Interval Mapping methodology, a QTL region into LG 1 was identify, with a LOD score = 10, containing the markers ISSR-811-350, ISSR-836-280 and HPMS-2-21 and it was extended by 49 cM, between the distances 10 cM and 59 cM of the GL 1.

This result indicates the possibility of using methodologies of marker-assisted selection for resistance to *P. capsici* in the pepper breeding program of INIA.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Capsicum*

1.1.1 Origen, domesticación y distribución.

El género *Capsicum* corresponde a un género que engloba aproximadamente unas 36 especies descritas hasta el momento (Pozzobon y col., 2006). Sin embargo, nuevas exploraciones en regiones de Brasil, Bolivia y Perú podrían aumentar el número de especies conocidas por sobre las 40 (Eshbaugh 2012). Taxonómicamente, se encuentra en la tribu Capsiceae (subtribu Capsinae), dentro de la familia Solanaceae (Hunziker 2001), familia de alta importancia en el ámbito agronómico debido a que también incluye a especies como el tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), entre otras.

Capsicum es nativo de los trópicos y subtropicos de América, teniendo dos centros de domesticación: uno en América Central (región mesoamericana) y el otro en la región andina de América del Sur (Paran y col., 2007). Según sugiere Hunziker (2001), los centros posteriores de distribución se concentraron en el sur de Estados Unidos, México, noreste y costa este de Brasil, región costera de Venezuela, zona central de Bolivia y Paraguay norte-centro de Argentina.

De las 36 especies pertenecientes al género, solo cinco han sido independientemente domesticadas y utilizadas, principalmente, para su uso como condimento y consumo fresco de su fruto (Andrews, 1995; Bosland y Votava, 2000). Estas cinco especies son *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C.*

baccatum y *C. pubescens*, de las cuales las tres primeras corresponden a las principales cultivadas comercialmente alrededor del mundo.

El género se caracteriza por la presencia de compuestos alcaloides llamados capsaicinoides (entre ellos, la capsaicina, causante de la sensación de picor o pungencia en los *Capsicum* tipo ají), los cuales han tenido repercusión en los procesos evolutivos del *Capsicum*. Tewksbury y col., (2006) estudiaron la variación de la pungencia en términos geográficos en tres especies de *Capsicum* ancestrales de Bolivia, encontrando que la producción de capsaicinoides varía a través de las diferentes elevaciones analizadas. El estudio sugiere que los capsaicinoides han implicado costos y beneficios en respuesta a la presión de selección. Se ha planteado la hipótesis de que esta característica evolucionó para disuadir a herbívoros mamíferos debido a que la trituración y los efectos de la digestión ácida de las semillas son perjudiciales para la supervivencia de éstas. Por otro lado, debido a que las aves no perciben la pungencia en respuesta a la capsaicina y, además, se sienten atraídas por los frutos de colores brillantes de *Capsicum*, se ve favorecida la dispersión de la semilla (Tewksbury y Nabhan 2001).

1.1.2 Taxonomía y Genética

La **Tabla I** resume la taxonomía del género *Capsicum*.

Tabla I Taxonomía del género *Capsicum*.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Tribu	<i>Capsiceae</i>
Subtribu	<i>Capsinae</i>
Género	<i>Capsicum</i>

Las especies del género *Capsicum* pueden distinguirse en dos grupos basados en el número de juegos cromosomales, $2n = 24$ y $2n = 26$. Solamente una especie, *C. annum* var. *glabriusculum* ha sido documentada como tetraploide ($2n = 4x = 48$) (Pickersgill 1977). Las especies de *Capsicum* evolutivamente más avanzadas muestran un mayor contenido de ADN (3,35-5,77 pg en ADN haploide) y mayor porcentaje de heterocromatina (1,8-38,9% de la longitud del cariotipo) (Pickersgill, 1977, citado en Mongkolporn y Taylor, 2011). Moscone y col. (2007) propusieron una posible relación evolutiva entre las especies de *Capsicum* basados en las características de sus cariotipos (**Figura 1**).

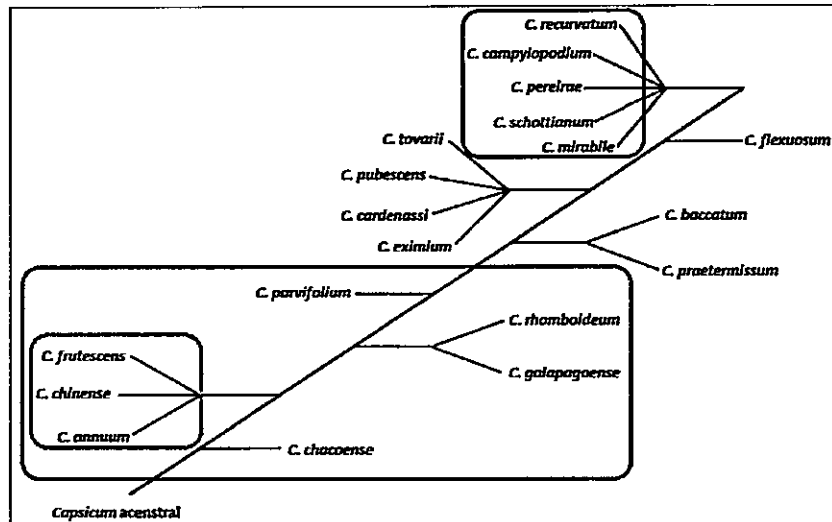


Figura 1 Posibles relaciones evolutivas de especies del género *Capsicum*, basado en estudios de cariotipos. En verde se encuentran las especies con rasgo común de flor blanca y en azul se enmarca al complejo evolutivo *C. annuum*. Desde el *Capsicum* ancestral hasta *C. flexuosum*, las especies se presentan con carga genética $2n = 24$. En rojo se muestra al grupo con carga genética $2n = 26$ (Imagen adaptada de Moscone y col., 2007).

Todas las especies provienen de un ancestro en común diploide ($x = 12$). *C. chacoense* se diferenció tempranamente, y posteriormente lo hizo el complejo denominado complejo *C. annuum*, que involucra las especies *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, las que evolucionaron en las zonas bajas tropicales de México, El Caribe y Amazonas, respectivamente (Eshbaugh 2012). Las especies del grupo más primitivo comparten la característica de poseer flores blancas y se suman, a las ya mencionadas, las especies *C. galapagoense*, *C. rhomboideum* y *C. parvifolium*. Las especies evolutivamente recientes comienzan con *C. baccatum* y *C. praetermissum*, y desde aquí se desprenden 3 grupos aun más recientes, presentándose el grupo donde se encuentra *C. mirabile* con 13 pares de cromosomas ($2n = 26$).

La cercanía genética y evolutiva del complejo *C. annuum* fue también

comprobada por Walsh y Hoot (2001) analizando la región cloroplastidial no codificante *atpB-rbcL*, en conjunto con cinco regiones intrónicas del gen nuclear *waxy*, debido a que ambas regiones presentan sustituciones, inserciones y deleciones a nivel de especie (Figura 2).

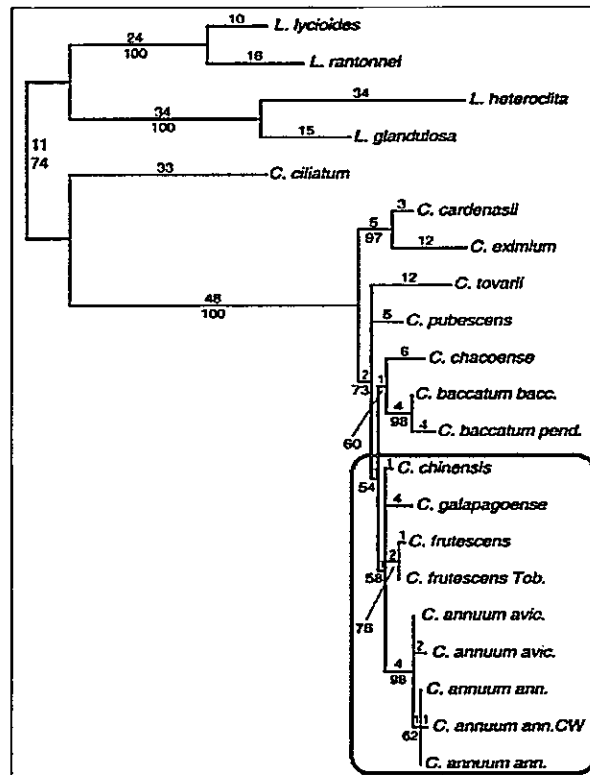


Figura 2 Posición filogenética del complejo *C. annum*. El complejo se enmarca en azul, diferenciándose genéticamente del resto. Imagen adaptada de Walsh y Hoot (2001).

1.2 El pimiento (*Capsicum annum* var. *annuum*)

1.2.1 Aspectos botánicos

El pimiento es un arbusto herbáceo, pequeño, ramificado, anual o perenne que alcanza entre 30 a 80 centímetros de altura. Tiene una raíz pivotante, corta o profunda dependiendo del genotipo. Presenta filotaxia alterna, solitaria o en pares con pecíolos

entre 4-7 centímetros de longitud. El limbo de la hoja puede ser oblongo, ovado u ovado-lanceolado, entre 4-13 cm de largo x 1,5-4 cm de ancho. Su inflorescencia son flores solitarias o racimos de dos flores, de coloración blanca con cinco pétalos y cáliz acampanado. Posee cinco estambres, cuyas anteras son azuladas/violáceas. Exhibe ovario superior con numerosos óvulos, estilo corto y estigma capitado. El fruto corresponde a una baya de pericarpio carnoso y firme, hueco, colgante, de color verde en estadios tempranos de desarrollo que luego evoluciona mayoritariamente a colores anaranjado, rojo, amarillo, blanquesino, café y púrpura (Bosland y Votava 2000, **Figura 3**).



Figura 3 Morfología de planta y principales órganos de pimienta. .a) Plántula en estado de desarrollo de cuatro hojas verdaderas, cuyos cotiledones aún se pueden observar. b) arquitectura típica de una planta de pimienta. c) frutos en distinto estado de desarrollo: inmaduro (verde), maduros (rojo). d) flor previa a antesis. En este estado se lleva a cabo el proceso de autofecundación. e) flor completamente abierta, sin embargo, la fecundación ya fue realizada y el fruto se encuentra en sus etapas iniciales de desarrollo y f) zona adaxial de una hoja de pimienta.

1.2.2 Estadísticas productivas del pimiento

1.2.2.1 Situación del cultivo del pimiento en el mundo

Según los datos actualizados de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), al año 2013, los principales países productores de *C. annuum*, tanto para ajíes y pimientos verdes (consumo fresco) como deshidratados se muestran en las Figuras 4 y 5 respectivamente. China lidera la producción mundial de pimiento verde con casi 16 millones de toneladas, seguido lejanamente por México, con 2,3 millones de toneladas anuales. En el caso de la producción para deshidratados, el principal productor es India, con un poco menos de 1,37 millones de toneladas, cuadruplicando la producción del segundo país más importante, China, con 300.000 toneladas anuales.

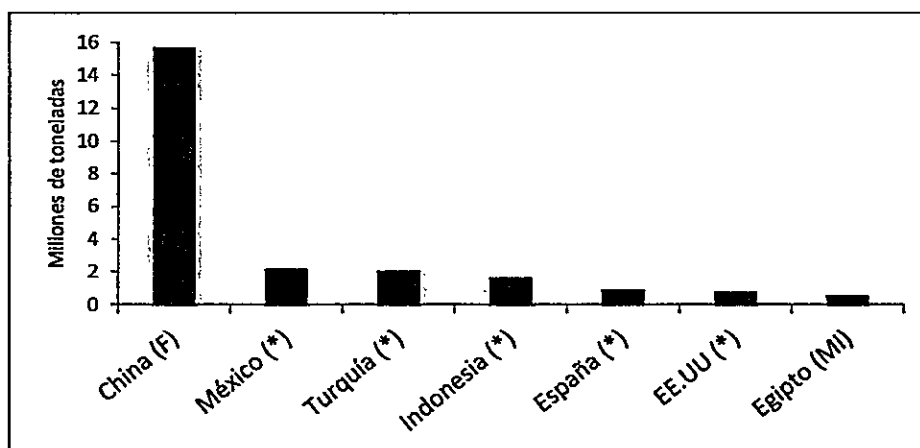


Figura 4 Principales países productores de ají y pimiento verde al año 2013. . (F) Cifras estimadas por la FAO, (*) Cifras oficiales, (MI) Cifras estimadas mediante metodología de imputación de datos. Gráfico realizado en base a los datos encontrados en el sitio oficial de FAO.

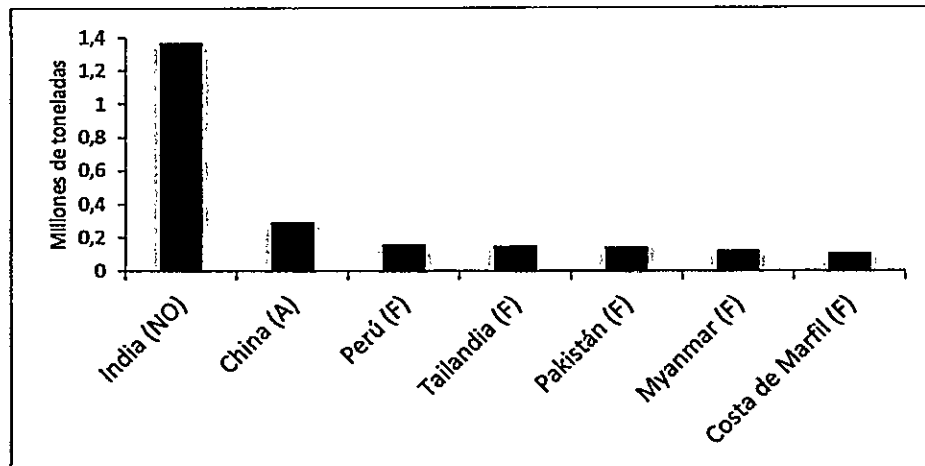


Figura 5 Principales países productores de ají y pimienta deshidratado al año 2013. (NO) Cifras no oficiales, (A) Cifras pueden incluir datos oficiales, semi-oficiales, estimados o calculados, (F) Cifras estimadas por la FAO. Gráfico realizado en base a los datos encontrados en el sitio oficial de FAO.

Respecto a las estadísticas y tendencias de producción, rendimiento y área de cultivo (**Figura 6**), se observa un constante aumento en estos tres parámetros evaluados por FAO, y si bien es cierto que la producción ha aumentado en buena parte por el aumento del área destinada al cultivo, el rendimiento ha tenido solo un sutil incremento en los últimos años, posiblemente como consecuencia de los factores ambientales que afectan la producción de *Capsicum* (salinidad, disponibilidad hídrica, bajas temperaturas, plagas y enfermedades).

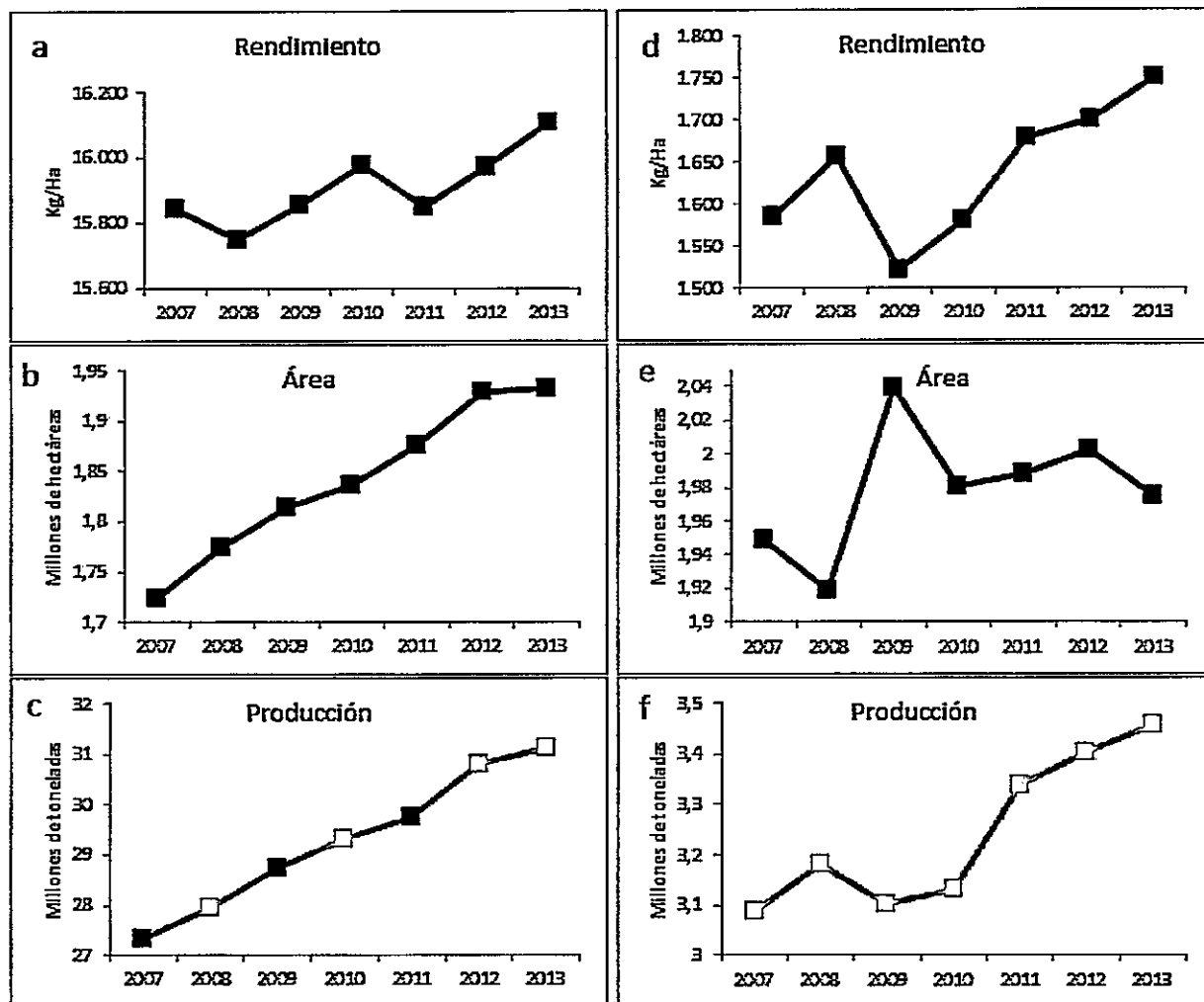


Figura 6 Tendencias mundiales de rendimiento, área de cultivo y producción de pimientos y ajíes. a), b) y c) corresponden a estadísticas para fruto verde, mientras que d), e) y f) representan las estadísticas para la industria de fruto deshidratado. Los datos fueron graficados en base a las estadísticas oficiales proporcionadas por el sitio web oficial de FAO.

1.2.2.2 Situación del cultivo del pimiento en Chile

Los valores FOB (*free on board*) en dólares de las exportaciones de pimientos para los años 2011 y 2012 en sus principales formatos son resumidos en la **Tabla II**.

Tabla II Exportaciones chilenas de pimientos procesados para las temporadas 2011 y 2012 (Fuente: ODEPA).

Producto	Año		Variación
	2011	2012	%
Deshidratado	\$7.453.291	\$4.323.421	-42
Conserva	\$2.000.947	\$194.812	-90,3
Néctar y jugo	\$1.937.786	\$2.612.206	+34,8

Según las estadísticas oficiales entregadas por la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), al año 2014 se registraron 913,1 hectáreas productivas de pimiento, siendo las regiones de Coquimbo, O'higgins y Arica y Parinacota las que lideraron a nivel nacional las superficies plantadas con 296, 164 y 142 hectáreas, respectivamente. El comportamiento de la superficie destinada a la plantación de pimiento se ha visto drásticamente disminuida desde el año 2010 al 2014, principalmente por la carencia de precipitaciones y heladas que ha mermado el establecimiento del cultivo en las principales regiones productivas del país, lo que ha mermado además el valor monetario de las exportaciones, como se aprecia en la **Tabla II** (revista Red agrícola, **Figura 7**).

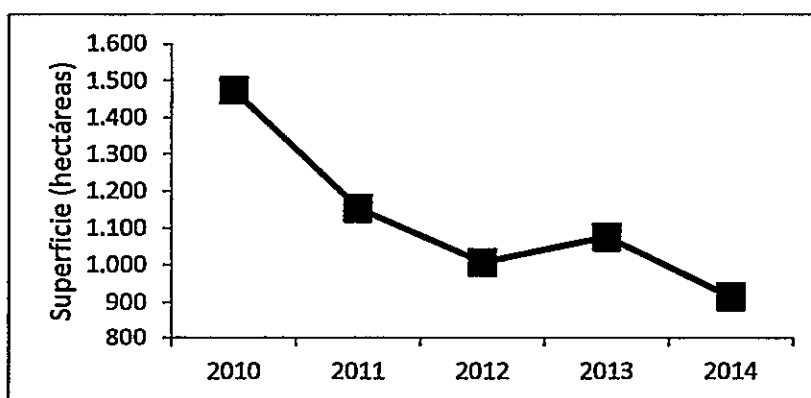


Figura 7 Estimación de superficie plantada de pimiento a nivel nacional para los años 2010 al 2014 en Chile (Fuente: ODEPA).

El rendimiento promedio a nivel nacional alcanza los 36.960 Kg/há (muy por debajo de Holanda que presenta los mejores rendimientos con 225.000 Kg/há) presentándose las regiones de Arica y Parinacota, Maule y Atacama como líderes en este ámbito con 46.500, 45.900 y 42.470 Kg/há respectivamente (**Figura 8**).

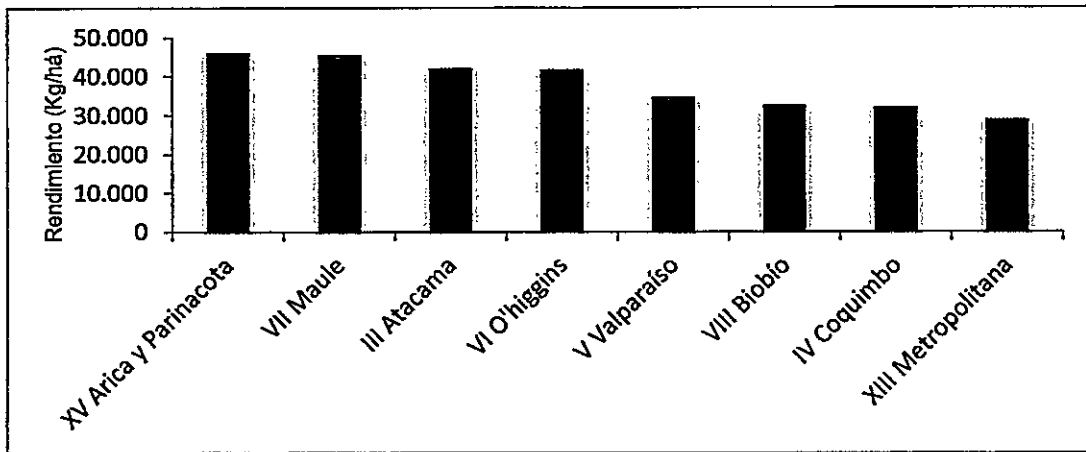


Figura 8 Rendimiento unitario de pimienta por región (Fuente: ODEPA).

Cabe destacar, además, el sistema de riego utilizado en Chile para este cultivo, puesto que el agua de riego es una de las principales vías de transmisión de agentes patógenos, especialmente de aquellos que producen estructuras reproductivas e infectivas móviles, como el caso de las zoosporas de *Phytophthora capsici*. En las regiones Metropolitana, O'higgins y Maule, sobre el 90% del sistema de riego se basa en sistema por surco (sistema que favorece la propagación de zoosporas de *P. capsici*), mientras que en las regiones de Coquimbo y Valparaíso este sistema representa más del 60%. El promedio nacional de cada sistema de riego se resume en la **Figura 9**.

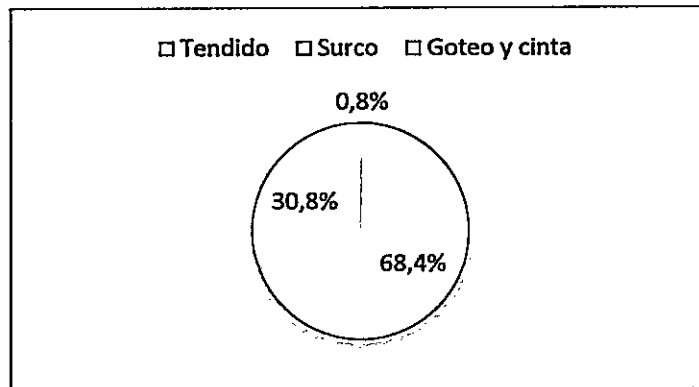


Figura 9 Superficie Nacional Regada de Pimiento, por método de riego (%) (Fuente: ODEPA).

1.2.3 Limitantes sanitarias en la producción del pimiento

1.2.3.1 Patógenos asociados al cultivo

El cultivo del pimiento se ve altamente afectado por una amplia gama de agentes patógenos responsables de la disminución del rendimiento y producción. Dentro de esta amplia gama, destacan el virus del mosaico del pepino (CMV) (Yao y col., 2013; Choi y col., 2015), potivirus (Inoue-Nagata y col., 2002; Rubio y col., 2008), mildiús (Lefebvre y col., 2003; Ajithkumar y col., 2014), antracnosis (Park y col., 2012; Sun y col., 2015), nemátodos (Fazari y col., 2012; Aguiar y col., 2014), xantomonas (Park y col., 2006; Moreira y col., 2015) y oomicetes (Johnstone y col., 2005; Zhang y col., 2013) (entre muchos otros); estos últimos como principal foco de estudio en los últimos años debido a la alta incidencia y severidad de la enfermedad, los altos costos económicos asociados a tareas de prevención y mitigación y los problemas que conlleva para los productores el acopio y eliminación del material vegetal afectado (Hausbeck y Lamour 2004).

1.2.3.2 *Phytophthora capsici* L., el patógeno más relevante en el cultivo del pimiento

Phytophthora capsici L. es un oomicete patógeno de cultivos altamente dinámico y destructivo. Fue descrito por primera vez en 1922 luego de ser aislado desde plantas de ají en México (Leonian, 1922, citado en Lamour y col., 2012). En un principio se asumió como huésped específico del pimiento, sin embargo, se ha reportado su presencia en tomate, berenjenas, cucurbitas (pepino, melón, calabaza, etc.) y de forma reciente en algunas variedades de porotos (Lamour y col., 2012). Aunque no se conoce cómo *P. capsici* pudo dispersarse a través de grandes distancias, este patógeno se ha reportado a través de casi todo el mundo incluyendo Norteamérica, Sudamérica, Asia, África y Europa (Hwang y Kim 1995; Sun y col., 2008). En pimiento representa uno de los patógenos más devastadores, atacando plantas en todos sus estados de desarrollo y en todos sus tejidos (Quirin y col., 2005) (Figura 10). Este oomicete causa variados síntomas dependiendo del tejido infectado, tales como pudrición de raíz, del cuello, del fruto y de plántulas, causando el tizón foliar, lesiones de tallos y, en plantas adultas, retraso del crecimiento, marchitez y, eventualmente, la muerte de éstas. Debido a esto, el patosistema (o sea, todo el conjunto de fenómenos e interacciones que se producen en relaciones de parasitismo) de *P. capsici* ha sido más difícil de estudiar en comparación a otros patógenos (Valenzuela y col., 2002). Es un patógeno de transmisión por suelo, hemibiótrofo, con reproducción sexual y asexual (Bonnet y col., 2007), produciendo problemas persistentes en regiones de cultivo extensivo de pimiento.





Figura 10 Síntomas y signos producidos por la infección de *P. capsici* en plantas de *C. annuum*. a) Marchitez foliar b) Necrosis en regiones de tallos y c) Colonización del fruto por micelio. Imágenes tomadas desde <http://www.longislandhort.cornell.edu/>.

La infección comienza cuando una hifa desde una oospora germinada, un esporangio germinando o una zoospora enquistada, penetra los tejidos externos de la planta, logrando acceso a células hospederas. En algunos casos es posible apreciar estructuras apresorias en el sitio de infección. Posterior a la invasión, se genera un proceso de colonización dentro de los tejidos del hospedero, proceso que culmina con el colapso y necrosis del tejido y la esporulación. Bajo óptimas condiciones (25-30°C y alta humedad relativa), el tiempo desde la infección a la esporulación tarda entre 2-3 días (Lamour y col., 2012).

1.3 Mapas de ligamiento genético en *Capsicum*

Peterson (1959) abrió el camino del mapeo genético clásico en *Capsicum* usando marcadores fenotípicos y estudiando el ligamiento entre tres genes que controlan la forma de fruto (*O*), color morado de fruto inmaduro (*A*) y color amarillo de fruto inmaduro (*G₁*). El ligamiento entre los genes *A* y *O* fue verificado, posteriormente, por Ben Chaim y col. (2003) y los genes se asignaron al cromosoma 10. Más tarde,

Pochard (1977) extendió el análisis de ligamiento usando características fenotípicas que incluían pungencia (*Pun1*), rasgos morfológicos (*xantha 3* y *xantha 8*), fruto erecto (*up*) resistencia al virus del mosaico del tomate TMV (*L*), modificador de acumulación de antocianinas (*MoA*), acumulación de antocianinas (*A*) y color de fruto amarillo (*Ccs*).

El primer mapa de ligamiento usando marcadores moleculares (del tipo isoenzimas) fue realizado por Tanksley (1984), quien usó una población proveniente de un cruzamiento interespecífico entre *C. annuum* y *C. chinense* para mapear 14 isoenzimas. Tanksley y col. (1988), posteriormente, desarrollaron el primer mapa genético usando marcadores genéticos del tipo RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés) en base a dos poblaciones segregantes: una proveniente de la cruce entre *Solanum lycopersicum* y una especie silvestre de tomate y la otra proveniente de *C. annuum* con una especie silvestre de *Capsicum*. Con esto además mostraron las relaciones sinténicas entre estas dos especies evidenciando, a este nivel de resolución genética, una alta conservación del genoma, pero además una considerable tasa de reordenamiento de varias regiones compartidas.

Ya desde 1999 comenzó la utilización marcadores basados en PCR tales como RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados) y SSR (microsatélites) principalmente (Livingstone y col., 1999; Lefebvre y col., 2002; Lee y col., 2009), permitiendo la mayor saturación de los mapas en términos de disminuir la distancia de recombinación entre marcadores y mejorando la precisión en la detección de loci de rasgos cuantitativos (QTLs, por sus siglas en inglés) y la estimación de efectos de dominancia aditiva de los alelos asociados a un QTL.

Respecto a las poblaciones para la construcción de los mapas de ligamientos, destacan las poblaciones F_2 provenientes de cruzamientos inter e intraespecíficos, retrocruzamientos (BC, por su nombre en inglés Backcrossing, tanto BC_1 como BC_2) y en los últimos años las poblaciones derivadas desde dobles haploides (DH) y líneas de recombinación endogámica (RIL, por su sigla en inglés).

1.4 QTLs asociados a resistencia a *P. capsici*.

Diversos estudios han revelado la existencia de un control poligénico en la respuesta de *C. annuum* al ataque de patógenos como *P. capsici* (Lefebvre y col., 2003; Thabuis y col., 2003; Ogundiwin y col., 2005; Quirin y col., 2005; Yang y col., 2009; Lu y col., 2012) utilizando como parental resistente casi exclusivamente el genotipo "Criollo de Morelos 334" (CM 334). Los estudios indican la presencia de QTLs en diferentes cromosomas con efectos menores, medios y mayores sobre la resistencia. En este contexto destacan los estudios realizados por Thabuis y col. (2004), quienes mediante el seguimiento de los marcadores colindantes con un QTL ligado a la resistencia a *P. capsici* en *C. annuum*, lograron la introgresión de éste en tan solo 3 ciclos de retrocruzamiento, comenzando con una población doble-haploide. Por otro lado, Quirin y col. (2005) mapearon una región relacionada con resistencia a *P. capsici* denominada como *Phyto 5.2* ubicada en el cromosoma 5 de *C. annuum*, en la cual fue generado un marcador tipo SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) para la detección de este QTL (Figura 11).

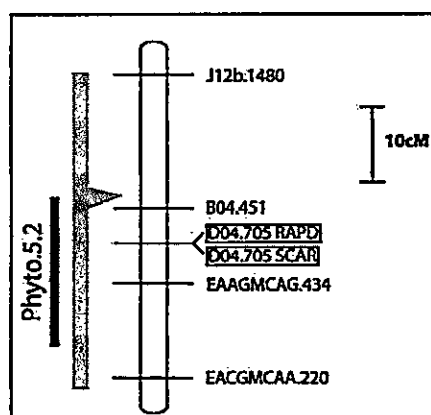


Figura 11 Región QTL Phyto 5.2 detectada por Quirin y col. (2005). La región se ubica en el cromosoma 5 de *C. annuum*. Enmarcados en negro se indican los marcadores RAPD y SCAR generados para la detección del QTL.

Por otra parte, un locus denominado “locus *L*” (localizado en un grupo de genes de resistencia, R-genes), ha sido descrito como responsable de la resistencia a variados patógenos como Potivirus, Virus del mosaico del pepino (CMV), Virus del bronceado del tomate (TSWV) y *Phytophthora capsici* de manera transversal en especies de la familia *Solanaceae* (*C. annuum*, *Solanum tuberosum* y *S. lycopersicum*) (Yang y col., 2009). Adicionalmente, en los últimos años Lu y col. (2012) mediante el uso de marcadores de polimorfismo de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) mapearon una región en los cromosomas 4 y 5, los cuales mostraron un efecto aditivo de -0,466 y -1,478 respectivamente, indicando su uso potencial de introgresión en programas de mejoramiento genético.

Otros estudios han puesto en evidencia el control genético de la característica, apoyando la hipótesis que se trata de un rasgo de control poligénico. Además del mapeo de regiones cromosómicas extensas involucradas en la respuesta de resistencia, la heredabilidad de ésta (o sea, la proporción de la variación fenotípica

explicada por el componente genético) ha sido descrita como media a alta, con valores de heredabilidad fluctuando entre 0,80 y 0,96 (de un máximo de 1), indicando que los valores fenotípicos se ven débilmente afectados por efectos ambientales y responden en mayor medida al efecto genético (Bonnet y col., 2007).

1.5 Efectos del estrés biótico sobre la eficiencia fotosintética, intercambio gaseoso y estado Redox de las plantas

Los agentes patógenos son capaces de afectar el desempeño fotosintético, tanto alterando el metabolismo que lo subyace, la fotoquímica primaria, transporte electrónico, ciclo de Calvin y la disminución del área fotosintética (Tabla III). Se estima que, en promedio, un 15% de las pérdidas de rendimiento en diferentes cultivos se debe a enfermedades causadas por agentes patógenos (Oerke y Dehne, 2004).

En el caso de las infecciones causadas por hongos, Baron y col. (2012) afirman que los efectos sobre la planta son más variados que, por ejemplo, los causados por virus debido, principalmente, a la existencia de diferentes modos o mecanismos de entrada y acción del hongo en la planta hospedera (ej: infección por sistema vascular, foliar, interacciones micorrízicas, etc).

1.5.1 Efectos del estrés biótico sobre la eficiencia fotosintética del PSII y el contenido de clorofila

La alteración de la eficiencia del PSII (medida, en hojas adaptadas a oscuridad como $(F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m$, donde F_o es la fluorescencia mínima medida cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos, F_m es la fluorescencia máxima después de un pulso de luz actínica medida cuando todos los centros de reacción se encuentran cerrados y F_v representa el diferencial entre F_m y F_o) frente a estrés biótico causado por

infecciones fúngicas ha sido evidenciada. Por ejemplo, en plantas de *Solanum tuberosum* infectadas con *Phytophthora infestans* se demostró una disminución en los valores medidos de F_v/F_m , así como un incremento del apagamiento fotoquímico (qP) en estadios tempranos de infección, indicando una alteración de la función del PSII (Koch y col., 1994). En otro estudio, Fleishmann y col. (2005) mostraron que la eficiencia del PSII, potencial hídrico foliar y el consumo total de agua disminuyeron, presentándose síntomas de marchitamiento foliar en plántulas de haya inoculadas con *Phytophthora citricola*.

Otro parámetro poco estudiado, relacionado con la captación de energía lumínica, es el contenido de clorofila en plantas bajo estrés biótico infectadas a nivel radicular por hongos. Allardyce y col. (2012) inocularon vía radicular plantas de *Zea mays* (resistente) y *Lupinus angustifolius* (susceptible) con zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* y analizaron el contenido relativo de clorofila mediante un medidor de clorofila no destructivo (SPAD-502), cada 24 horas durante 6 días. Los resultados fueron contrastante. Mientras que para *Zea mays* el contenido de clorofila aumentó desde el día 0 al 48 y se mantuvo posteriormente constante hasta el último día de medición, en *Lupinus angustifolius* el contenido de clorofila tuvo un leve aumento entre el día 0 y el día 1, luego se mantuvo constante hasta el día 3 y, finalmente comenzó con una disminución sostenida hasta el día 6 de medición. En otro estudio, Moreno-Chacón y col. (2013) inocularon raíces de plantas de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) con *Phytophthora palmivora* y estudiaron, entre varios parámetros, el contenido de clorofila a través de diferentes estadios de la enfermedad. Los resultados mostraron también una disminución del contenido de clorofila (desde 13,2 –

Tabla III Tabla adaptada de Baron y col. (2012), describiendo los efectos de varios agentes de estrés biótico sobre parámetros fotosintéticos, intercambio gaseoso y efectos foliares. La importancia relativa de cada factor se indica como: "-", efecto no descrito en literatura; "X", efecto descrito ocasionalmente; "XX", efecto descrito en varias ocasiones y "XXX", efecto principal. (*) Incluye forma y tamaño de la hoja, estructura foliar interna y forma y distribución de organelos. El autor destaca que un parámetro no marcado como "Importante" no significa que éste no lo sea, sino que la información disponible en ese caso es fragmentada y algunos de esos parámetros no han sido analizados bajo algunos de los estreses bióticos aquí descritos.

Agente patógeno		Virus	Bacterias	Hongos de infección vascular	Hongos de infección foliar	Nemátodos
Defoliación, destrucción y/o necrosis foliar	Importante	-	-	X	XXX	X
Limitaciones estomáticas	Importante	-	XX	XXX	X	X
	Efectos estructurales (*)	XXX	X	X	X	-
	Reacciones fotosintéticas primarias	XXX	XXX	X	X	-
Limitaciones no estomáticas	Reacciones del ciclo de Calvin	XX	X	X	XX	-
	Transporte y metabolismo de carbohidratos	XX	X	-	XX	-

9,6 – 7,8 – 7,8 $\frac{\text{ng clorofila}}{\text{mg Peso fresco}}$, los cuales representan diferentes estados de desarrollo de la enfermedad desde planta sana hasta un 80-100% del área foliar afectada).

1.5.2 Efectos del estrés biótico sobre el intercambio gaseoso de la hoja

En el caso de hongos de infección vascular (como es el caso de *P. capsici*), la mayoría de estos se desarrollan al interior de los vasos xilemáticos de la planta

hospedera, provocando una disminución de la conductancia hídrica, lo cual lleva a un severo marchitamiento foliar. Los parámetros relacionados con la asimilación de CO_2 (A_n) y conductancia estomática (g_s) también han reportado variación durante la interacción incompatible ante diferentes patógenos. Por ejemplo, se ha documentado la reducción de la A_n entre un 30-90%, la cual, como explican los autores, fue causada típicamente por una reducción de la g_s en plantas de pimiento y tomate inoculadas con *P. capsici* y *Fusarium*, respectivamente (Aguirreola y col., 1995; Nogués y col., 2002), aunque también es sabido que un estrés hídrico (en este caso, gatillado por la supresión del transporte de agua) genera daños a enzimas claves del ciclo de Calvin (Kaiser, 1976). En el caso de las infecciones foliares producidas por hongos, también se produce una disminución de la A_n , pero esta vez causada principalmente por la disminución del área foliar fotosintéticamente activa. Incluso, en este mismo ámbito, se han documentado decrecimientos de la A_n en tejidos aparentemente no infectados, los cuales pueden llegar hasta un 30-50% (Manter y col., 2007; Agati y col., 2008).

Moreno-Chacón y col. (2013) encontraron disminuciones de la A_n y g_s de un 72,46% y 74,98% respectivamente en plantas de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) inoculadas con *Phytophthora palmivora*. Fleishmann y col. (2005), en el mismo estudio mencionado en el punto 1.5.1 hallaron una disminución de las tasas de A_n en estadios muy tempranos de infección, indicando la existencia de señales móviles desde la raíz hacia órganos foliares. Se ha sugerido además que las plantas detienen su fotosíntesis y otros metabolismos asociados para iniciar respiración y procesos relacionados con la defensa ante el ataque del patógeno (Berger y col., 2007).

Los antecedentes indican, por lo tanto, que los hongos de acción vascular pueden comprometer el transporte de agua y reducir la fotosíntesis debido, en una

primera instancia, a la inducción del cierre estomático, lo cual puede conllevar una posterior degradación de la clorofila y daños a los componentes principales de los centros fotosintéticos, pero también la dinámica del ciclo de Calvin puede ser afectada por la presencia de EROs, como es el caso de H₂O₂.

1.5.3 Efectos del estrés biótico sobre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

A pesar que es bien sabido que una acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) es perjudicial para el desarrollo y metabolismo vegetal, estas juegan un papel fundamental en la respuesta al estrés biótico, y se han postulado muchas funciones de estas ante la infección por patógenos en plantas.

Se ha sugerido que la producción explosiva de EROs es utilizada para generar la muerte directa del patógeno debido a su alta reactividad, especialmente de las EROs que presentan radicales hidroxilos (Chen y Shopfer, 1999). Estas EROs además son capaces de actuar como señalizadores del estrés. Hüchelhoven (2007) sostiene que las EROs están implicadas en la generación de barreras físicas que impiden la entrada y establecimiento del patógeno, promoviendo la biosíntesis de pared celular, lignina y polímeros de suberina. Thoma y col. (2003) afirman que las EROs están involucradas en la generación de fitoalexinas y metabolitos secundarios que detienen el crecimiento del patógeno. También se han visto íntimamente ligadas a los procesos de reacción hipersensitiva (HR), el cual es un proceso de muerte celular programado que ocurre en el sitio de infección y que tiene por objetivo limitar la dispersión y avance del patógeno a través del tejido ya infectado (Mur y col., 2008). Otros estudios sostienen que las EROs no producen la muerte directa del patógeno, sino que más bien generan

cambios en el pH y en el flujo de iones, gatillando la activación de proteasas específicas en fagocitos, las cuales son los encargados finales de la muerte del patógeno (Segal, 2008).

En el caso de *C. annuum*, se ha corroborado que genotipos resistentes a *P. capsici* son capaces gatillar procesos de limpieza de EROs por una mayor y más temprana activación de las enzimas peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) y la polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1) en comparación a genotipos susceptibles (Jung y col., 2004). Situación similar fue verificada por Koç y col. (2011), quienes encontraron concentraciones más bajas de H₂O₂ y menor daño lipoperoxidativo en genotipos resistentes a *P. capsici* en comparación a los susceptibles, utilizando diferentes concentraciones de inóculo.

Sin embargo, la acumulación de EROs se ha descrito como un agente causante de daño en el fotosistema II (PSII), especialmente en componentes principales tales como la proteína D1, de enzimas importantes del ciclo de Calvin y de la peroxidación de membranas lipídicas celulares, afectando de esta forma la transferencia de energía lumínica a través de los fotosistemas y cadena transportadora de electrones y la asimilación de CO₂, lo que trae como consecuencia directa un déficit del metabolismo general de la glucosa. (Nishiyama y col., 2004; Murata y col., 2007).

Por lo tanto, el estudio de la dinámica de producción y limpieza de EROs se convierte en una herramienta de apoyo en la búsqueda y selección de genotipos resistentes a *P. capsici*.

1.6 Hipótesis

Existen loci de rasgos cuantitativos (QTLs) controlando la resistencia a *Phytophthora capsici* en una población de mapeo F₂ de *Capsicum annuum*, proveniente del cruzamiento entre parentales contrastantes para la característica.

1.7 Objetivo general

Identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia a *P. capsici* en una población segregante de *C. annuum*.

1.8 Objetivos específicos

- 1) Establecer la divergencia genética entre 57 accesiones de *C. annuum*.
- 2) Evaluar parámetros fisiológicos (fotosintéticos, intercambio gaseoso y contenido de EROs) en genotipos resistentes y susceptibles a *P. capsici* a fin de seleccionar parentales para una población de mapeo de QTLs.
- 3) Generar un mapa de ligamiento genético para la población de mapeo usando marcadores moleculares dominantes y codominantes.
- 4) Asociar probabilísticamente marcadores moleculares a la característica de resistencia a *P. capsici* en *C. annuum*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Divergencia genética en 57 accesiones de *Capsicum annum*

Los trabajos de invernadero se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA La Platina (La Pintana, Santiago), mientras que las amplificaciones de microsatélites y electroforesis se realizaron en el Laboratorio de Fisiología y Genética Hortícola y en el Centro de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

2.1.1 Selección del material vegetal

Se seleccionaron 57 genotipos de *C. annum*, de los cuales 20 correspondían al tipo ají y 37 al tipo pimienta (Tabla IV). Dentro de los tipo pimienta se encontraban 2 genotipos resistentes a *P. capsici* (RESISTANT y PHYTOSUN), cuya resistencia fue informada por parte de la empresa semillera respectiva.

Tabla IV Genotipos de *C. annum* utilizados en este estudio y el tipo cuyo fenotipo representa. Los genotipos marcados con asterisco (*) representan genotipos comerciales.

Accesión	Tipo	Accesión	Tipo	Accesión	Tipo	Accesión	Tipo
66	Ají	182	Ají	636	Pimienta	757	Pimienta
68	Ají	171	Ají	654	Pimienta	763	Pimienta
76	Ají	172	Ají	655	Pimienta	765	Pimienta
153	Ají	190	Ají	659	Pimienta	766	Pimienta
155	Ají	191	Ají	661	Pimienta	1777	Pimienta
156	Ají	183	Ají	662	Pimienta	1784	Pimienta
157	Ají	560	Pimienta	663	Pimienta	1789	Pimienta
158	Ají	571	Pimienta	664	Pimienta	Cruz 7	Pimienta
165	Ají	579	Pimienta	666	Pimienta	Cruz 8	Pimienta
166	Ají	580	Pimienta	667	Pimienta	*California Wonder	Pimienta
167	Ají	582	Pimienta	675	Pimienta	*FINITA	Pimienta
168	Ají	606	Pimienta	677	Pimienta	*Fyuco	Pimienta
169	Ají	614	Pimienta	751	Pimienta	*PHYTOSUN	Pimienta
173	Ají	615	Pimienta	753	Pimienta	*RESISTANT	Pimienta
						*Tambora	Pimienta

2.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo de forma masiva, es decir, se realizaron recolectando la misma cantidad de tejido foliar desde 10 individuos de una misma accesión, hasta completar 100 mg. El material utilizado fue hojas nuevas desde plantas de 60 días post-germinación, las cuales fueron crecidas en almacigueras de hasta alcanzar el tamaño adecuado para extraer tejido foliar. Los 100 mg de tejido se trituraron en mortero con N₂ líquido hasta lograr un polvo fino. Se añadieron 800 µL de Buffer CTAB 2X (1,4 M de NaCl, 100 mM Tris pH 8,0 y 20 mM de EDTA pH 8,0) precalentado a 65°C y 1,6 µL de β-mercaptoetanol. Se continuó con la trituración hasta lograr un homogenizado líquido que fue trasferido a un tubo eppendorf de 1,7 uL. Se añadieron 8 µL de proteinasa K, se mezcló con la ayuda de vórtex y se dejó incubar a 60°C durante 30 min. Posterior a esto, los tubos se dejaron enfriar por 15 min a temperatura ambiente y se llevaron a centrifugación por 15 min a 12.000 rpm.

Se rescató el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y se le añadió a cada tubo 1 µL de RNasa A. Se mezcló suavemente con vórtex y se incubaron los tubos a 37°C durante 30 min. Una vez terminado el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionó 0,4 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (respecto al volumen rescatado en paso anterior) y se mezcló por inversión, teniendo la precaución de no formar emulsión entre las fases. Los tubos se llevaron a centrifugación por 15 min a 12.000 rpm. Una vez finalizado el proceso de centrifugación, se procedió a rescatar el sobrenadante y añadir 1 volumen de isopropanol frío y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2. Los tubos se mantuvieron a -20°C toda la noche para permitir la precipitación del ADN.

A la mañana siguiente, los tubos se llevaron a centrifugación por 20 min a 8.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol al 80%. El pellet se dejó secar en estufa a 40°C, y una vez totalmente seco se resuspendió en 50 µL de buffer TE para su posterior cuantificación y verificación de calidad.

2.1.3 Condiciones de PCR y prueba de polimorfismo de partidores microsatélites

Para seleccionar los marcadores polimórficos, se evaluaron 87 pares de primers SSR previamente descritos (Lee y col., 2004; Minamiyama y col., 2006; Ince y col., 2010). El polimorfismo de cada SSR se evaluó en tres accesiones seleccionadas aleatoriamente y se seleccionaron 12 SSR para el análisis de divergencia.

Para las amplificaciones de las regiones SSR (tanto para la prueba de polimorfismo como para el estudio de divergencia) se utilizaron 25 ng de ADN, 2,0 µL de buffer PCR 10X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM de cada primer SSR, en un volumen final de 20 µL. Las amplificaciones de los SSR se llevaron a cabo mediante un protocolo Touchdown (Don y col., 1991) (Tabla V).

Tabla V PCR Touchdown realizada para la amplificación de los SSR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación	94°C	1 min	
Denaturación	94°C	1 min	
Alineamiento	65°C (-1°C por ciclo)	1 min	X 9
Extensión	72°C	2 min	
Denaturación	94°C	1 min	
Alineamiento	55°C	1 min	X 30
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	2 min	

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa Metaphor:agarosa común al 4% en relación 1:1, usando buffer TBE 1%. La electroforesis fue llevada a cabo a 60 V durante 4 horas. Los geles se tiñeron usando Gel Red o solución de Bromuro de Etidio por 40 min.

2.1.4 Determinación de distancias genéticas entre accesiones

La matriz de distancias genéticas entre accesiones fue construida de forma manual en base al complemento del índice de similitud genética (Yao y col., 2007) como:

$$D_{ij} = 1 - GS_{ij} = 1 - \left\{ 2 \left[\frac{N_{ij}}{N_i + N_j} \right] \right\}$$

donde D_{ij} es la distancia genética entre las accesiones i y j , GS es el coeficiente de similitud genética entre accesiones i y j , N_{ij} representa el número de alelos comunes totales entre las accesiones i y j y N_i y N_j es el número de alelos totales en las accesiones i y j respectivamente.

2.1.5 Selección del mejor método de agrupamiento para construcción del dendrograma de divergencia genética

El dendrograma fue construido usando los métodos de agrupamiento UPGMA y Neighbor Joining utilizando un proceso de bootstrapping de 5.000. Para cada dendrograma se midió el Coeficiente de Correlación Cofenética (CCC) (Saraçlı y col., 2013) como:

$$CCC = \frac{\sum_{i < j} (x(i,j) - x)(t(i,j) - t)}{\sqrt{[\sum_{i < j} (x(i,j) - x)^2][\sum_{i < j} (t(i,j) - t)^2]}}$$

donde $x(i,j)$ representa el índice de distancia genética entre las accesiones i y j proveniente de la matriz de distancia genética de Yao y col. (2007), $t(i,j)$ representa el valor de la distancia cofenética extraída desde el dendrograma para las accesiones i y j y x y t representan el promedio de las distancias genéticas y cofenéticas para todos los pares de accesiones. El dendrograma final se construyó usando la herramienta online <http://www.trex.uqam.ca>.

2.2 Evaluación del efectos de la infección por *P. capsici* sobre la eficiencia del PSII, intercambio gaseoso y producción de EROs para selección parental

2.2.1 Material vegetal

Se seleccionaron semillas desde el banco de germoplasma de INIA La Platina de los genotipos PHYTOSUN (R), RESISTANT (R), PIM 677 (S), FINITA (S) y CALIFORNIA WONDER (S). Las semillas se hicieron pre-germinar en placas Petri dentro de cámaras de crecimiento a 24°C y fotoperiodo 16:8 h día/noche. Una vez emergida la radícula, estas se sembraron en almacigueras forestales que contenían sustrato compuesto por turba:perlita en relación 1:1. Se mantuvieron en crecimiento en condiciones de invernadero a 24°C ±3°C con riego constante hasta que las plantas alcanzaron el tamaño y desarrollo adecuado para iniciar el ensayo.

2.2.2 Preparación del inóculo

La cepa virulenta comprobada de *P. capsici* para este trabajo fue provista por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) gracias a la gestión realizada por el laboratorio de

Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-CRI La Platina, a cargo de la Ingeniero Agrónomo Paulina Sepúlveda (**Figura 12**). El patógeno fue mantenido en el tiempo mediante siembras sucesivas de micelio en medio agar-papa dextrosa (ampliamente conocido como medio PDA) a una temperatura de 24°C.



Figura 12 Micelio de *P. capsici* después de 12 días de crecimiento. Al centro se aprecia una sección circular remanente del proceso de repique para mantención del hongo en el tiempo en medio PDA.

2.2.3 Método de inoculación

La inoculación se llevó a cabo en plantas de *C. annuum* que tuviesen un desarrollo de 6-8 hojas verdaderas. Para ello, se tomaron placas Petri sembradas con micelio de *P. capsici* de 10-12 días de crecimiento, asegurando que el micelio cubriera la totalidad de la superficie de crecimiento que permite la placa. Posteriormente el contenido de la placa Petri (medio PDA + micelio) fue homogenizado en 50 mL de agua destilada autoclavada y se vertió el contenido en el cuello de la planta (**Figura 13**).



Figura 13 Procedimiento de inoculación con micelio activo en el cuello de la planta.

2.2.4 Diseño experimental para evaluación de parámetros fisiológicos

Con la finalidad de seleccionar genotipos contrastantes a la resistencia, se realizaron mediciones de la eficiencia fotoquímica del PSII, asimilación de CO₂, cuantificación de clorofilas totales, EROs y MDA.

Se seleccionaron dos genotipos resistentes (RESISTANT y PHYTOSUN) y dos genotipos susceptibles (FINITA y PIM 677) a *P. capsici*. Como control positivo de infección se utilizó el genotipo CALIFORNIA WONDER, el cual es ampliamente conocido por su alta susceptibilidad a este patógeno (Ezziyyani y col., 2004; Candole y col., 2012).

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar, con 5 repeticiones por genotipo (Figura 14). Este ensayo fue hecho en duplicado debido a que algunas mediciones eran de carácter destructivo (cuantificación de clorofilas, EROs y MDA).

R I	PHYTOSUN	PIM 677	RESISTANT	CALIFORNIA WONDER	FINITA
R II	RESISTANT	CALIFORNIA WONDER	PHYTOSUN	PIM 677	FINITA
R III	PIM 677	PHYTOSUN	CALIFORNIA WONDER	FINITA	RESISTANT
R IV	CALIFORNIA WONDER	RESISTANT	PIM 677	PHYTOSUN	FINITA
R V	FINITA	CALIFORNIA WONDER	PIM 677	RESISTANT	PHYTOSUN

Figura 14 Diseño experimental para la evaluación de fluorescencia de clorofila, intercambio gaseoso, cuantificación de clorofila, EROs y MDA. En verde se presentan los genotipos parentales resistentes y en amarillo los genotipos parentales susceptibles. El genotipo CALIFORNIA WONDER se utilizó como control para verificar la infección de las plantas.

2.2.5 Medición de la eficiencia fotosintética del PSII

Debido a que la infección por *P. capsici* generará una situación de estrés, se decidió analizar la eficiencia fotosintética del PSII (F_v/F_m), basado en los antecedentes expuestos anteriormente, los cuales indican la posibilidad de daño a los centros de reacción del PSII.

La medición de la eficiencia fotosintética del PSII (evaluada como F_v/F_m) se realizó usando un fluorómetro modelo FMS2 portátil (Hansatech Instruments Ltd. Inglaterra). Para esto, la sección foliar a medir fue mantenida en oscuridad con pinzas especiales durante 40 minutos previos a la medición (**Figura 15a y 15b**). Todas las mediciones mencionadas se realizaron en los días 0, 3, 7 y 14 posteriores a la inoculación.

2.2.6 Cuantificación de clorofilas totales

Para verificar si existe una relación entre una posible disminución de la fotosíntesis y el contenido de clorofila, se procedió a cuantificar el contenido de estas en diferentes tiempos posterior a la inoculación.

El diseño experimental para muestreo y posterior cuantificación de clorofilas totales fue el mismo mostrado en la Figura 14. Para esto, discos de 0,6 cm de diámetro desde tejido foliar fueron triturados usando N₂ líquido en mortero. Una vez obtenido un polvo fino se añadieron 5 mL de acetona fría 80% v/v y se continuó macerando hasta obtener un homogenizado líquido. Se procedió a centrifugar el homogenizado obtenido a 2.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se midió en espectrofotómetro. Las concentraciones de clorofila a (c_a) y clorofila b (c_b) se estimaron de acuerdo a Lichtenthaler y Buschmann (2001) como:

$$c_a = (11,24 * A_{663}) - (2,04 * A_{647})$$

$$c_b = (20,13 * A_{647}) - (4,19 * A_{663})$$

donde A_{663} y A_{647} son las absorbancias de las muestras a 663 y 647 nm respectivamente. Los datos fueron expresados posteriormente como mg/m² (miligramos de clorofilas totales (clorofila a + clorofila b) por metro cuadrado) (Madeira y col., 2003).

2.2.7 Medición de la asimilación de CO₂ (A_n) y conductancia estomática (g_s)

Debido al estrés hídrico provocado por el patógeno, se realizaron mediciones de la asimilación de A_n y g_s , esta última relacionada directamente con los procesos de apertura y cierre estomático.

Para medir los parámetros de intercambio gaseoso se utilizó el analizador de gases infrarrojo (InfraRed Gas Analyzer, IRGA) marca LICOR modelo 6400X (Figura 15c y 15d). Las mediciones se realizaron en condiciones de invernadero, con una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, entre las 9:30 y 12:30 horas, usando una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 600 nm y un flujo de CO_2 de 400 ppm, basado en curvas previas de calibración para pimiento realizadas en el Laboratorio de Fisiología y Genética Hortícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA La Platina. Las mediciones mencionadas se realizaron en los días 0, 3, 7 y 14 posteriores a la inoculación, siguiendo el mismo diseño experimental de la Figura 14. El fenotipado fue realizado en base a una escala visual de 1 a 4, donde 1 representa una planta sin marchitez visible hasta 4 que es una planta que llegó a caída producto de la marchitez generada producto de la inoculación.

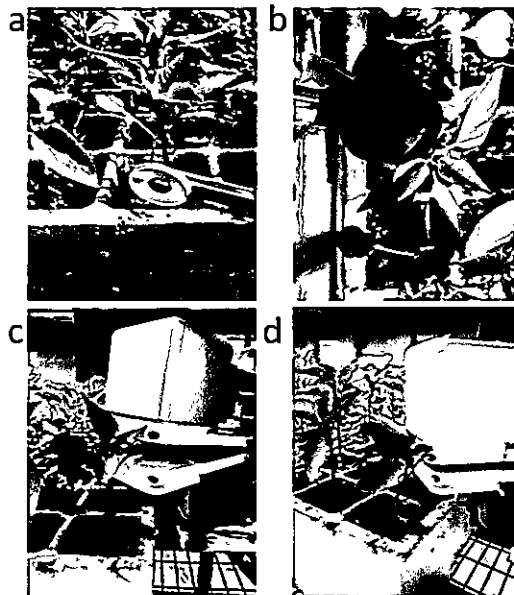


Figura 15 Procedimientos de medición con analizador de gases infrarrojo (IRGA, modelo Licor 6400X) y fluorómetro de pulso modulado (FMS2 de Hansatech). a) cámara de medición de IRGA abierta para posicionar la hoja previo a la medición, b) cámara herméticamente cerrada a fin de evitar fugas, c) clip para aclimatación en oscuridad de la región foliar previo a medición fluorométrica con el FMS2 y d) acoplamiento de la lámpara de pulso

lumínico.

2.2.8 Diseño experimental para evaluación de producción de EROs (H_2O_2) y daño lipoperoxidativo

Se propuso medir la acumulación^A de H_2O_2 a diferentes tiempos posterior a inoculación debido a que esta ERO corresponde a una especie intermediaria proveniente de otras EROs vía acción enzimática, y además, es la ERO con mayor actividad funcional encontrada en procesos de estrés biótico. El daño celular generado por la acumulación de H_2O_2 se verificó midiendo el contenido de malondialdehído (MDA), el cual es el principal producto de la peroxidación de las membranas lipídicas celulares.

Para la cuantificación de H_2O_2 se utilizó el mismo diseño experimental mostrado en la Figura 14. La cuantificación de H_2O_2 fue realizada en base a Velikova y col. (2000). Para ello se tomaron 500 mg de tejido foliar, los cuales se homogenizaron en frío con 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% p/v. El homogenizado se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min y, finalizado el proceso, 0,5 mL de sobrenadante se añadieron a 0,5 mL de buffer fosfato de potasio 10 mM pH 7,0 y 1 mL de ioduro de potasio (KI) 1 M. La absorbancia del sobrenadante se midió a los 390 nm en espectrofotómetro y la concentración de H_2O_2 fue calculada en base a una curva de calibración hecha previamente. Las muestras fueron tomadas a las 0, 12, 24, 48 y 96 horas posteriores a la inoculación.

La cuantificación de la lipoperoxidacion se hizo determinando la concentración de malondialdehído (MDA), el cual es un producto de la peroxidación de las membranas lipídicas celulares. Para ello se utilizó el mismo diseño experimental mostrado en la Figura 14. Para esto, 1 g de tejido foliar se homogenizó en 5 mL de

TCA 0,1% p/v. El homogenizado se llevó a centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min. Posterior a este proceso se rescataron 0,5 mL del sobrenadante, el cual fue añadido a una solución de 1,5 mL de TCA 20% que contenía ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% p/v. La mezcla se calentó a 95°C durante 30 min e inmediatamente después se puso en hielo. La muestra se centrifugó y se midió la absorbancia a 532 nm, a la cual le fue sustraída la densidad óptica para absorbancia no específica a los 600 nm. La concentración de MDA se calculó en base a su coeficiente de extinción molar ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las muestras fueron tomadas a las 0, 12, 24, 48 y 96 horas posteriores a la inoculación.

2.2.9 Análisis de componentes principales entre variables

La variación conjunta de las variables medidas (daño, F_v/F_m , A_n , g_s , EROs, MDA y clorofila) fueron analizadas mediante un método multivariado de análisis componentes principales (ACP) usando el programa STATGRAPHICS CENTURION XV, con la finalidad de determinar correlación entre variables y la distribución de los genotipos analizados a través de estas.

2.3 Mapeo de QTLs en población segregante F_2

2.3.1 Población de mapeo, inoculación y fenotipado.

Para el mapeo de QTLs se utilizó una población F_2 compuesta de 180 individuos provenientes de un cruzamiento entre un genotipo resistente con uno susceptible, basado en los resultados obtenidos de los puntos 2.1 y 2.2. Las condiciones de inoculación fueron las mismas mencionadas en el punto 2.2.3. El

fenotipado fue realizado en base a una escala visual de 1 a 4, donde 1 representa una planta sin marchitez visible hasta 4 que es una planta que llegó a caída producto de la marchitez generada producto de la inoculación (**Figura 30 Anexo**).

2.3.2 Genotipado de población F₂

La población de mapeo se genotipo mediante 3 tipos de marcadores genéticos: Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), Randon Amplified Polymorphism DNA (RAPD) y Simple Sequence Repeat (SSR).

2.3.2.1 Amplificación de las regiones ISSR

Los partidores ISSR utilizados se detallan en la **Tabla VI**.

Tabla VI Secuencia de partidores tipo ISSR utilizados para la construcción del mapa de ligamiento. H: (A, C ó T); R: (A o G); Y: (C o T); B: (C, G o T) y V: (A, C o G).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
811	GAGAGAGAGAGAGAC	Herrera y col. (2002)
818	CACACACACACACAG	Herrera y col. (2002)
820	GTGTGTGTGTGTGTC	Herrera y col. (2002)
825	ACACACACACACACT	Herrera y col. (2002)
826	ACACACACACACACC	Herrera y col. (2002)
827	ACACACACACACACG	Morales y col. (2001)
834	AGAGAGAGAGAGAGYT	Morales y col. (2001)
836	AGAGAGAGAGAGAGYA	Herrera y col. (2002)
840	GAGAGAGAGAGAGAYT	Herrera y col. (2002)
841	GAGAGAGAGAGAGAYC	Herrera y col. (2002)
845	CTCTCTCTCTCTCTRG	Morales y col. (2001)
848	CACACACACACACARG	Herrera y col. (2002)/ Morales y col. (2001)
849	GTGTGTGTGTGTGTYA	Morales y col. (2001)
860	TGTGTGTGTGTGTGRA	Morales y col. (2001)
888	BDBCACACACACACA	Herrera y col. (2002)
890	VHVGTTGTGTGTGTGT	Herrera y col. (2002)

Las amplificaciones de las regiones ISSR se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 30 ul, el cual contenía 0,6 mM de dNTPs, 1,5 U de Taq polimerasa,

1X buffer PCR, 5 mM de MgCl₂, 0,6 mM de primer y 50 ng de ADN. El programa de PCR consistió en un ciclo de denaturación inicial a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 44°C por 45 segundos y 72°C por 90 segundos, finalizando la reacción con un período de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 1,5% preparados con tampón TBE 1X.

2.3.2.2 Amplificación de las regiones RAPD

Las regiones RAPD amplificadas se detallan en la **Tabla VII**

Tabla VII Secuencia de partidores tipo RAPD utilizados para la construcción del mapa de ligamiento.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Nombre	Secuencia (5'-3')	Nombre	Secuencia (5'-3')
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPC-04	CCGCATCTAC	OPH-07	CTGCATCGTG
OPC-01	TTCGAGCCAG	OPH-04	GGAAGTCGCC	OPB-08	GTCCACACGG
OPH-01	GGTCGGAGAA	OPB-05	TGCGCCCTTC	OPC-08	TGGACCGGTG
OPB-02	TGATCCCTGG	OPC-05	GATGACCGCC	OPH-08	GAAACACCCC
OPC-02	GTGAGGCGTC	OPH-05	AGTCGTCCCC	OPB-09	TGGGGGACTC
OPH-02	TCGGACGTGA	OPB-06	TGCTCTGCCC	OPC-09	CTCACCGTCC
OPB-03	CATCCCCCTG	OPC-06	GAACGGACTC	OPH-09	TGTAGCTGGG
OPC-03	GGGGGTCTTT	OPH-06	ACGCATCGCA	OPB-10	CTGCTGGGAC
OPH-03	AGACGTCCAC	OPB-07	GGTGACGCAG	OPC-10	TGTCTGGGTG
OPB-04	GGA CTGGAGT	OPC-07	GTCCCGACGA	OPH-10	CCTACGTCAG

Las amplificaciones de las regiones RAPD se realizaron en un volumen final de 20 µL el cual contenía 50 ng de ADN genómico, 5 pM de partidor, 2,5 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa y buffer de PCR 1X. El programa de amplificación por PCR fue el siguiente: un ciclo de denaturación inicial a 94°C durante y minutos seguido de 39 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos, para finalizar con un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos.

2.3.2.3 Amplificación de regiones SSR

El protocolo de amplificación de regiones SSR y su separación de los productos mediante electroforesis fue el mismo descrito en el punto 2.1.3.

2.3.3 Construcción de mapa de ligamiento

La construcción del mapa de ligamiento se realizó con el programa MAPMAKER (Lander y col., 1987). Se utilizó un umbral de recombinación de 0,4, lo cual implica que marcadores con frecuencias de recombinación igual o superior a 0,4 se considerarán como marcadores no ligados. Además se asumió un valor LOD (por el inglés Logarithm (base 10) Of Odds) de 3, lo cual implica que dos marcadores con un valor de LOD igual o superior a 3 presentan ligamiento y su probabilidad de ligamiento es 1.000 (o más) veces mayor en comparación a un par de marcadores que se asuman no ligados.

2.3.4 Modelamiento estadístico de la asociación fenotipo-marcador

Se utilizaron dos modelos de asociación: un modelo exploratorio de regresión lineal simple y un modelo de mapeo por intervalo compuesto (MIC), el cual presenta mayor sofisticación estadística y que permite determinar posición e intervalo del o de los QTLs mapeados.

El modelo exploratorio correspondió a un modelo de regresión lineal utilizado fue el siguiente:

$$y = \beta_0 + \beta_1x + e$$

donde y es el valor fenotípico de un individuo, β_0 es la media poblacional de F_2 , β_1 es el efecto aditivo del locus sobre la característica y e es el término del error residual del modelo. x se relaciona con la codificación del locus bajo análisis (-1 o 1 para alelos provenientes de un marcador dominante y -1, 0 y 1 para alelos provenientes de marcadores codominantes, donde -1 y 1 corresponde a los genotipos homocigotos y 0 al genotipo heterocigoto).

El MIC permite reducir el error del modelo asociado a la precisión de la detección del QTL mediante la inclusión de cofactores, los cuales son posibles QTLs colindantes a la región que está siendo analizada. El modelo estadístico asociado al CIM se define como

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_nx_n + \beta_ix_i + e$$

donde $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ son los efectos aditivos de los n cofactores, x_1, x_2, \dots, x_n son los coeficientes para los n cofactores (-1 o 1 para alelos provenientes de un marcador dominante y -1, 0 y 1 para alelos provenientes de marcadores codominantes, donde -1 y 1 corresponde a los genotipos homocigotos y 0 al genotipo heterocigoto), β_i es el efecto aditivo de la posición del intervalo cromosómico que está siendo evaluado y x_i es el coeficiente para la posición del intervalo evaluado basado en los genotipos de los marcadores colindantes a la región evaluada.

3 RESULTADOS

3.1 Divergencia genética en 57 accesiones de *Capsicum annum*

3.1.1 Condiciones de PCR y prueba de polimorfismo de partidores SSR

De los 87 pares de partidores analizados se seleccionaron 12 SSR que presentaban amplificación clara por análisis de PCR y posterior visualización en transiluminador para los análisis de divergencia genética (Figura 16). El número promedio de alelos encontrados fue de 3,58, oscilando entre 2 y 8, siendo el locus Agi096 el más polimórfico con 8 alelos para la población total analizada (Tabla VIII).

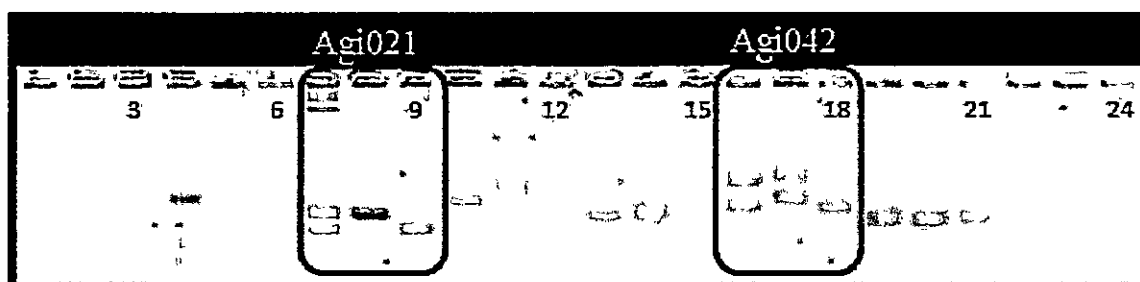


Figura 16 Test de polimorfismo de loci SSR para su selección en estudio de divergencia genética. Cada carril corresponde a una muestra de ADN amplificada seleccionada al azar entre las 57 accesiones analizadas. Cada set de partidores se analizó en 3 accesiones. Se enmarcan las muestras 7-9 y 16-18, en las cuales se verificó polimorfismo de los SSR Agi021 y Agi042.

Tabla VIII Detalle de los SSR amplificados para el análisis de divergencia genética. Motivo: Región repetida en tándem; NA: Número de alelos detectados para la población total de 57 accesiones de *Capsicum annum* analizadas.

Locus	Motivo	Secuencia	NA
Agi021	(TTTA) ₄	F: gccgtgagagagatgagac R: agggactgacacgaccaa	4
Agi033	(CAA) ₉	F: cgggtcglagtcaagaacaag R: cctcicaaccaagccaaact	4
Agi042	(AAC) ₇	F: ctcatcaacccacctcatca R: ttttcggagacggagcag	3

(Continuación Tabla VIII)

Agi086	(CTG) ₅	F: agtccttgccgatgtgaag R: gcagcagcagtaacctga	3
Agi096	(CAT) ₇	F: gggagagaaaatglaagca R: atccaacaatggcatccta	8
Agi098	AGA) ₁₂	F: ftccgagattgacacactgg R: agcaacttcagcagcaacc	4
CAMS-015	(AC) ₇ AT(AC) ₈ A(TA) ₇	F: tcatgttgattatgctttgttca R: ccaatglatglatgataacctgagaaa	2
CAMS-024	(TG) ₁₄ TT(TG) ₃	F: tgttgaggctgggaaaaac R: caagataatgggtgaaaggcaac	4
CAMS-117	(TG) ₂₁ (TA) ₃	F: ttgtggaggaaacaagcaaa R: cctcagcccaggagacataa	3
CAMS-153	(TA) ₇ (TG) ₁₄ CG(TG) ₆	F: tgcacaaatgaaatccaaga R: aagtcagcaaacacatctgacaa	2
Hpms 1-111	(AAT) ₁₁	F: aagcttatcccttcaaatataa R: atatctcacgtattgctgattctt	3
Hpms 1-145	(CT) ₂₁ (AT) ₁₃	F: agctgtgtcataalctgaaaaactc R: tgaaaagacgattttgtctaagcg	3

3.1.2 Selección del mejor método de agrupamiento

Para seleccionar el método de agrupamiento jerárquico que mejor representase la relación entre la distancia genética original entre accesiones y distancia cofenética del dendrograma, se utilizó como herramienta el coeficiente de correlación cofenética (CCC). Un mayor valor del CCC fue obtenido usando el método de agrupamiento NJ (Neighbor-Joining, CCC = 0,823), en comparación al CCC obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, CCC = 0,765), como se muestra en la **Figura 17**.



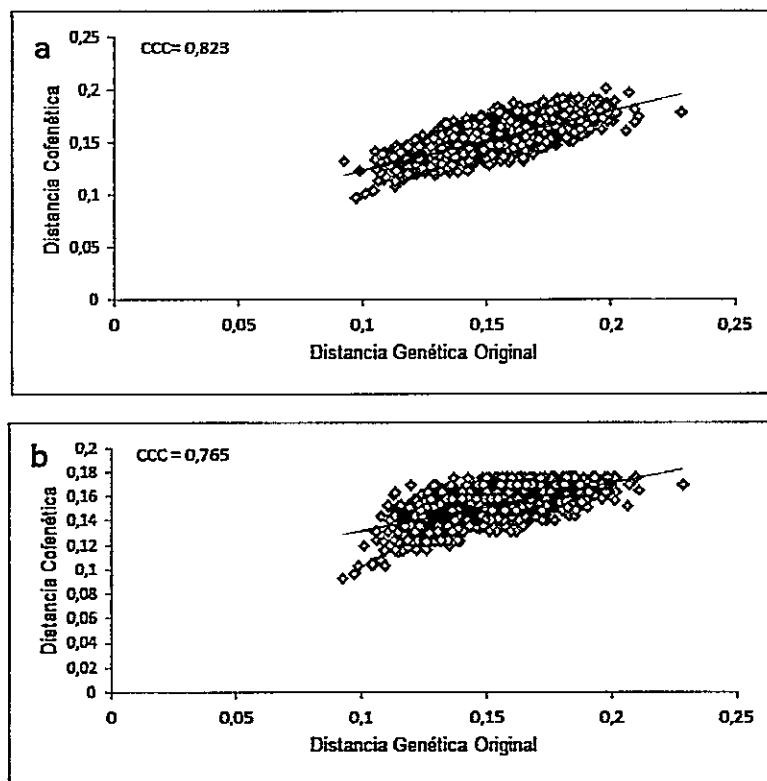


Figura 17 Coeficientes de correlación cofenética (CCC) para dos métodos de agrupamiento en 57 accesiones de *C. annuum*. a) Distancia genética de Yao usando el método de agrupamiento NJ y b) Distancia genética de Yao usando el método de agrupamiento UPGMA.

3.1.3 Construcción del dendrograma de relaciones genéticas entre 57 accesiones de *C. annuum*.

El dendrograma, construido en base a los resultados obtenidos mediante la determinación del CCC, se observa en la **Figura 29 (Anexo)**. Tres diferentes grupos pueden ser identificados. En el grupo 1 se agruparon todas las accesiones tipo ají, además del genotipo susceptible FINITA y el resistente PHYTOSUN. En el grupo 2 de encuentran los genotipos CALIFORNIA WONDER y RESISTANT, mientras que en el tercer grupo aparece la accesión susceptible PIM 677.

3.2 Análisis visual del daño y variables fisiológicas evaluadas en genotipos parentales de población de mapeo F₂

3.2.1 Evaluación visual del daño

Los resultados de la evaluación visual del daño se aprecian en la **Figura 30 (Anexo)**. De una escala visual de daño desde 1 a 4, donde 1 representa inexistencia de daño y 4 representa planta en suelo producto de la marchitez producida por *P. capsici*, los genotipos resistentes y susceptibles promediaron al día 14 valores de 1 y 4, respectivamente.

3.2.2 Evaluación de eficiencia fotosintética, clorofilas totales, intercambio gaseoso, H₂O₂ y MDA

Con la finalidad de seleccionar los genotipos más contrastantes en su respuesta ante el ataque del patógeno *P capsici*, de manera tal de ser utilizados como parentales de una población segregante F₂ destinada al mapeo de QTLs de resistencia, se procedió a realizar mediciones relacionadas con parámetros de eficiencia fotosintética del PSII (F_v/F_m), contenido de clorofilas totales, intercambio gaseoso (A_n y g_s) y producción de EROs (H₂O₂ y MDA) en los genotipos candidatos.

3.2.2.1 Eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII)

Debido a que el PSII es uno de los componentes de todo el sistema fotosintético más sensibles a los efectos de diferentes tipos de estrés, se propuso evaluar su funcionamiento mediante la medición la razón entre la fluorescencia clorofílica variable y la fluorescencia clorofílica máxima.

Los resultados indican que los valores de F_v/F_m comienzan a mostrar una disminución significativa por parte del genotipo PIM 677 (susceptible) 7 días después de la inoculación. Al día 14 posterior a inoculación, ambos genotipos susceptibles muestran bajas significativas en los niveles de F_v/F_m en comparación a sus controles al día 0 (disminuciones de 37,65% y 37,84% para los genotipos PIM 677 y FINITA, respectivamente) y a los genotipos resistentes en el día 14. Esta situación, sin embargo, no se ve reflejada en los genotipos PHYTOSUN y RESISTANT, los cuales presentan, en el día 14, valores promedio de F_v/F_m de 0,791 y 0,78, respectivamente, no apreciándose diferencias significativas con sus valores iniciales (0,817 y 0,821, respectivamente) (Figura 18).

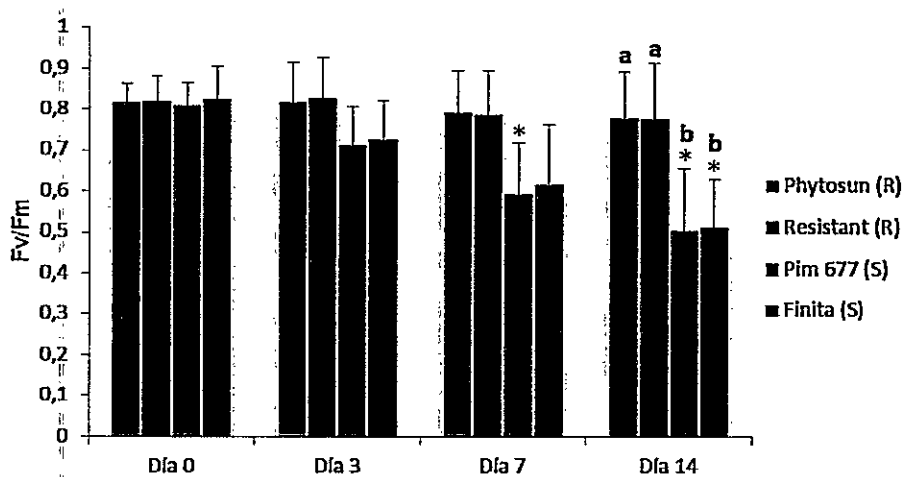


Figura 18 Eficiencia fotoquímica del PSII de los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación. Asteriscos indican diferencias significativas entre el genotipo y su control correspondiente al día 0, mientras que letras indican diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición ($p < 0,05$). Las comparaciones entre genotipos con su control respectivo al día 0 se realizaron mediante una prueba t-student pareada, mientras que las diferencias entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición se realizaron mediante un ANDEVA y posterior prueba de comparación de medias de Duncan.

3.2.2.2 Cuantificación de clorofilas totales

Los resultados para la cuantificación de clorofilas totales son mostrados en la **Figura 19**. Al día 0 ya existían diferencias en la concentración de clorofilas totales entre genotipos, siendo PIM 677 el que presentaba una menor concentración entre los 4 evaluados. No se observaron diferencias de las concentraciones entre los días 0 y 3. Las primeras diferencias (no producidas por el efecto genotipo) se observaron en el día 7 post inoculación, donde FINITA disminuye su concentración de clorofila. Las disminuciones del contenido de clorofilas se acentúan más en el día 14, momento en el cual FINITA alcanza su menor contenido, presentando diferencias significativas tanto con su control al día 0, como con la medición al día 7 ($p < 0,05$, no mostrado en gráfico). En el caso de PIM 677, su contenido al día 14 es diferente significativamente al día 0, no así al día 7. Los genotipos resistentes, si bien exhiben una leve disminución, ésta no es significativa respecto a su control al día 0.

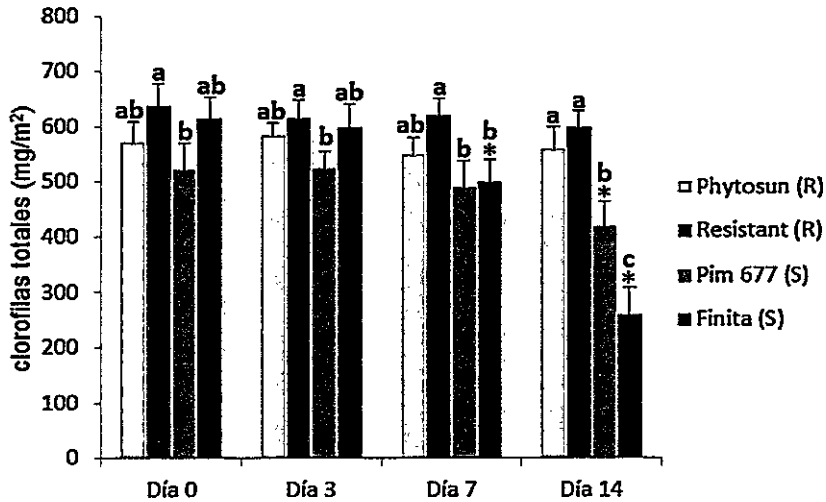


Figura 19 Contenido de clorofilas totales en los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación. Asteriscos indican diferencias significativas entre el genotipo y su control correspondiente al día 0, mientras que letras indican diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición ($p < 0,05$). Las comparaciones entre genotipos con su control respectivo al día 0 se realizaron mediante una prueba t-student pareada, mientras que las diferencias entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición se realizaron mediante un ANDEVA y posterior prueba de comparación de medias de Duncan.

3.2.2.3 Asimilación de CO_2 (A_n)

La evaluación de la fotosíntesis neta a través del tiempo fue determinada a través de la asimilación de CO_2 a nivel foliar (A_n) presentó diferencias significativas como se aprecia en la **Figura 20**. Al tiempo 0 de inoculación, los genotipos presentaban un promedio de A_n de $26,67 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, al día 7 posterior a la inoculación se observa un decaimiento significativo en los genotipos susceptibles (33,69% y 30,41% para PIM 677 y FINITA, respectivamente), acentuándose aún más en el día 14 de medición (59% y 69,6% para PIM 677 y FINITA, respectivamente), en el cual ambos genotipos susceptibles presentan niveles de asimilación neta menores en comparación a los genotipos resistentes.

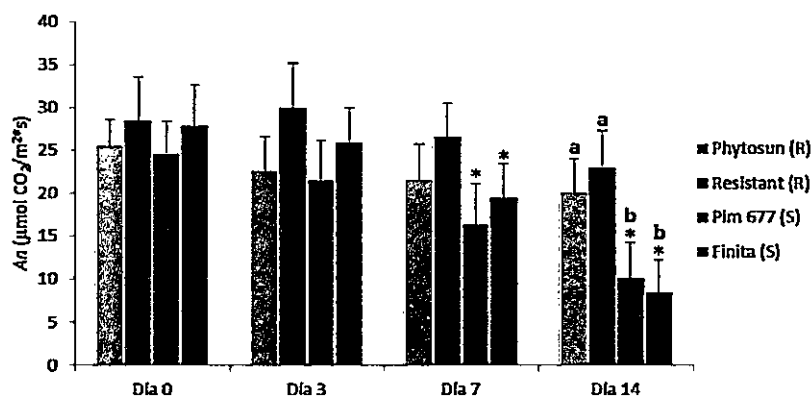


Figura 20 Fotosíntesis medida como la asimilación neta de CO₂ de los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación. Asteriscos indican diferencias significativas entre el genotipo y su control correspondiente al día 0, mientras que letras indican diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición ($p < 0,05$). Las comparaciones entre genotipos con su control respectivo al día 0 se realizaron mediante una prueba t-student pareada, mientras que las diferencias entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición se realizaron mediante un ANDEVA y posterior prueba de comparación de medias de Duncan.

3.2.2.4 Conductancia estomática (g_s)

Debido a que la infección por *P. capsici* genera una disminución del transporte hídrico xilemático producto del crecimiento del hongo dentro de estos y también una disminución de la asimilación de CO₂ en los genotipos susceptibles, se evaluó la apertura y cierre de los estomas. La propagación del hongo a través del xilema puede inducir un estrés hídrico, lo que implicaría un cierre estomático, lo que conlleva a una menor asimilación de CO₂.

La g_s (Figura 21) siguió un patrón de comportamiento similar al presentado por la A_n . Los cuatro genotipos presentan al día 0 un promedio de 0,505 mol H₂O m⁻²s⁻¹, manteniéndose sin variaciones significativas hasta el día 3 (promedio de 0,511 mol H₂O m⁻²s⁻¹). En el día 7 se aprecia un decaimiento de la g_s en genotipos susceptibles, situación que se acentúa aún más al día 14. Un punto importante a destacar es que el

genotipo FINITA presenta una disminución significativa de la g_s entre el día 7 y el 14 (prueba t-pareada, $p < 0,05$, no mostrado en gráfico), a diferencia del genotipo PIM 677, el cual no muestra disminuciones de la g_s posterior al día 7 de medición.

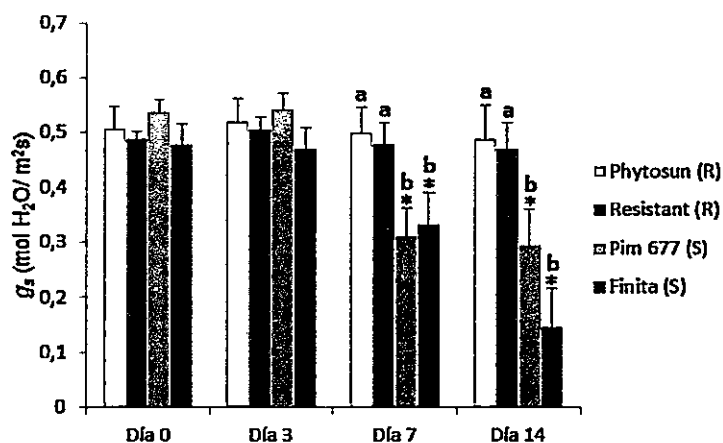


Figura 21 Conductancia estomática de los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 3 tiempos posteriores a la inoculación. Asteriscos indican diferencias significativas entre el genotipo y su control correspondiente al día 0, mientras que letras indican diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición ($p < 0,05$). Las comparaciones entre genotipos con su control respectivo al día 0 se realizaron mediante una prueba t-student pareada, mientras que las diferencias entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición se realizaron mediante un ANDEVA y posterior prueba de comparación de medias de Duncan.

3.2.2.5 Cuantificación de peróxido de hidrógeno

Como fue mencionado en el punto 1.5.3, las EROs (y, de manera especial el peróxido de hidrógeno) juegan un papel importante en las respuestas de las plantas antes estrés biótico, debido a su contribución en la activación de cascadas de respuesta ante estrés biótico, pero además, se han visto involucradas en la degradación de componentes estructurales y funcionales primordiales del complejo fotosintético PSII, especialmente de la proteína D1.

Los resultados muestran que el genotipo PHYTOSUN presenta el primer aumento significativo de H_2O_2 a la hora 12 posterior a inoculación, con un promedio de 2,95 μmol de H_2O_2/g P.F. Como se muestra en la **Figura 22**, la concentración de H_2O_2 continúa aumentando desde la hora 0 hasta la hora 48, tanto en genotipos resistentes como en susceptibles. Sin embargo, en la hora 48 se aprecia un estancamiento en el avance de la acumulación de H_2O_2 en los genotipos resistentes (promediando PHYTOSUN y RESISTANT concentraciones de 3,56 y 3,75 μmol de H_2O_2/g P.F respectivamente), a diferencia de los susceptibles, mostrando en las horas 48 y 96 posterior a inoculación diferencias significativas entre genotipos resistentes y susceptibles. Cabe mencionar también que en el caso de los genotipos resistentes, se aprecia una disminución significativa de la concentración de H_2O_2 entre las horas 48 y 96 ($p < 0,01$).

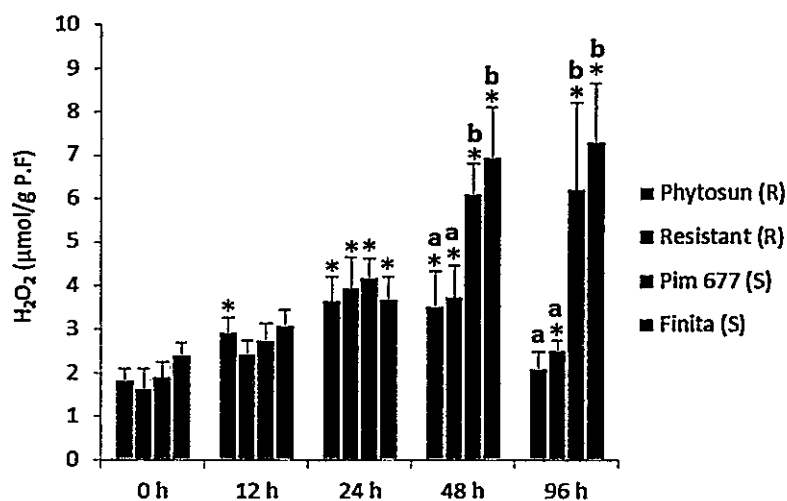


Figura 22 Contenido de peróxido de hidrógeno en los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 4 tiempos posteriores a la inoculación, expresado como μmol de H_2O_2 por gramo de peso fresco. Asteriscos indican diferencias significativas entre el genotipo y su control correspondiente a la hora 0, mientras que letras indican diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición ($p < 0,05$). Las comparaciones entre genotipos con su control respectivo a la hora 0 se realizaron mediante una prueba t-student pareada, mientras que las diferencias entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición se realizaron mediante un ANDEVA y posterior prueba de comparación de medias de Duncan.

3.2.2.6 Daño lipoperoxidativo

La cuantificación de malondialdehído (MDA) tiene directa relación con el daño celular producido por la acumulación de EROs, debido a que este es el producto más significativo de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular generados por las EROs.

El daño lipoperoxidativo, evaluado mediante la cuantificación de MDA, mostró un comportamiento similar al mostrado por la acumulación de H_2O_2 (Figura 23). Entre las horas 0 y 48 se observa un incremento constante y significativo del daño lipoperoxidativo, tanto en genotipos resistentes como susceptibles, exhibiendo aumentos de 40,9%, 59,45%, 66,23% y 81,04% para los genotipos PHYTOSUN, RESISTANT, PIM 677 y FINITA, respectivamente, en comparación a sus controles en la hora 0. Ya en la hora 96 se aprecia una detención del daño en genotipos resistentes, manteniéndose en 2,96 nmol/g P.F como promedio, no así en genotipos susceptibles, los cuales presentan un aumento considerable a la hora 96 al ser comparados con las muestras tomadas en la hora 48, llegando a niveles promedio de 6,13 nmol/g P.F ($p < 0,01$).

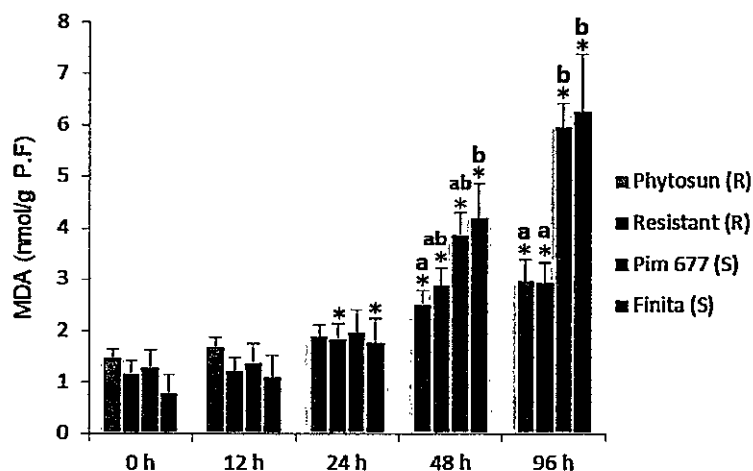


Figura 23 Contenido de malondialdehído (MDA) en los genotipos parentales en el tiempo 0 y a través de los 4 tiempos posteriores a la inoculación, expresado como nmol de MDA por gramo de peso fresco. Asteriscos indican diferencias significativas entre el genotipo y su control correspondiente a la hora 0, mientras que letras indican diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición ($p < 0,05$). Las comparaciones entre genotipos con su control respectivo a la hora 0 se realizaron mediante una prueba t-student pareada, mientras que las diferencias entre genotipos dentro de un mismo tiempo de medición se realizaron mediante un ANDEVA y posterior prueba de comparación de medias de Duncan.

3.2.3 Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados gráficos y numéricos del ACP para los últimos tiempos de medición son mostrados en la Figura 24 y Tabla IX, respectivamente.

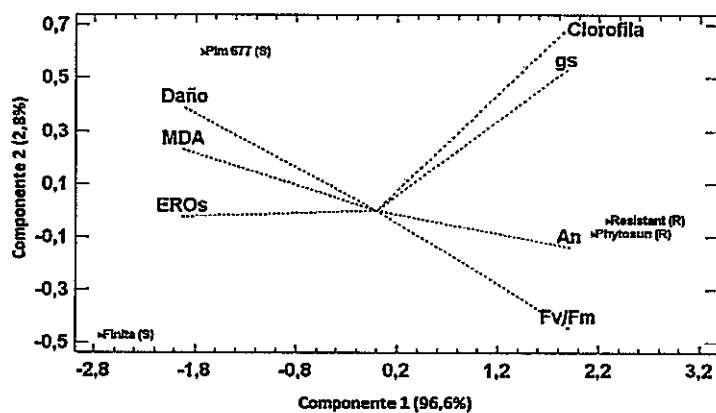


Figura 24 Gráfico biplot resultante del análisis de componentes principales para las variables fisiológicas y daño visual en los genotipos resistentes y susceptibles

evaluados como potenciales parentales de una población de mapeo genético. La contribución de cada componentes es mostrado en forma de porcentaje en cada eje.

Tabla IX Tabla de pesos de las variables dentro de cada componente. El porcentaje de contribución de cada componente se muestra entre paréntesis.

Variable	Componente 1 (96,6%)	Componente 2 (2,8%)
A_n	0,3797	-0,1293
F_v/F_m	0,3780	-0,4127
Clorofila	0,3683	0,6286
g_s	0,3740	0,4919
EROs	-0,3831	-0,0218
MDA	-0,3828	0,2148
Daño	-0,3796	0,3595

Los resultados indican que el componente 1 logró explicar un altísimo porcentaje de la variación total de los datos, con un 96,6%, dejando al componente 2 con solo un 2,8%. La contribución de cada variable dentro de cada componente (Tabla IX) muestra que, dentro del componente 1, todas las variables prácticamente contribuyen en igual medida la variación observada, mientras que en el componente 2, el contenido de clorofila, la g_s y el F_v/F_m fueron las variables con más peso en la variación observada.

3.3 Mapeo de loci de rasgos cuantitativos en población F_2

Debido a la alta similitud de comportamiento fenotípico (visual y fisiológico) de los genotipos resistentes, no existían evidencias para inclinar la decisión por la selección entre uno u otro genotipo, por lo cual se decidió seleccionar a PHYTOSUN como parental resistente. En el caso de la selección del genotipo susceptible, se optó por la selección del genotipo FINITA debido a que éste mostró disminuciones más marcadas en los día 14 de medición para las variables de conductancia estomática y contenido de clorofilas totales.

3.3.1 Distribución de los individuos de la F₂ a través del daño generado al día 14 post-inoculación

Una vez seleccionados los parentales, las semillas de la población de mapeo F₂ procedente del cruzamiento entre los genotipos PHYTOSUN y FINITA se germinaron, y las plántulas obtenidas se trasplantaron e inocularon usando los mismos procedimientos descritos en los puntos 2.2.1, 2.2.2 y 2.2.3. Los resultados de la evaluación visual del daño (conocido como marchitez o tristeza del pimiento) en la población F₂ se aprecian en la **Figura 25**. El fenotipo de las plantas para cada nivel de daño (desde 1 a 4) se presenta en la **Figura 30 (Anexo)**.

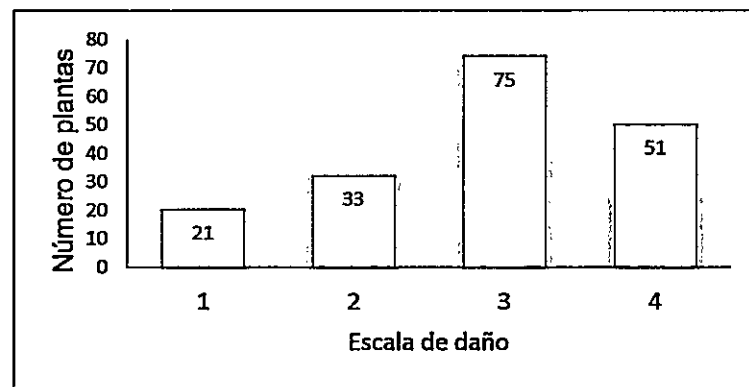


Figura 25 Distribución de los individuos de la población de mapeo F₂ a través de los diferentes niveles de daño al día 14 post-inoculación.

El nivel que presentó el mayor número de individuos al día 14 fue el nivel 3 (75 individuos), seguido del 4 (51 individuos), 2 (33 individuos) y 1 (21 individuos).

3.3.2 Cuantificación alélica y filtrado de marcadores para construcción de mapa de ligamiento

Los resultados de las amplificaciones de los marcadores indicaron que, de 205 alelos detectados para los marcadores dominantes ISSR y RAPD, 174 fueron

polimórficos entre los parentales, y de estos 174 alelos polimórficos, 29 alelos (16,6%) presentaron distorsión de segregación en la población F_2 en base a la prueba Chi-cuadrado, la cual se aplica esperando una segregación 1:1 de los alelos polimórficos en los parentales, por tratarse de marcadores dominantes los cuales se presentan como presencia o ausencia de banda.

En el caso de los SSR, de 87 marcadores evaluados solo 30 se presentaron como polimórficos entre los parentales. De estos 30, 17 SSR presentaron distorsión de segregación en base a la prueba Chi-cuadrado, la cual se aplica esperando que la proporción de segregación sea 1:2:1 (homocigoto alelo 1: heterocigoto: homocigoto alelo 2) por tratarse de un marcador codominante (Tabla X).

Tabla X Resumen de la amplificación de los marcadores para la construcción del mapa de ligamiento en población F_2 . El concepto loci es utilizado para indicar, solo en esta tabla, una región única a amplificar (*) (como es el caso de los SSR) o varios alelos amplificados en regiones azarosas del genoma (**) (como es el caso de los marcadores RAPD e ISSR).

Marcador	Marcadores evaluados	Loci amplificados	Loci Polimórficos	Loci con distorsión de segregación	Loci usados en mapa
SSR	87	87 (*)	30 (*)	17 (19,54%) (*)	13 (*)
ISSR	16	94 (**)	75 (**)	16 (17,02%) (**)	59 (**)
RAPD	30	111 (**)	99 (**)	13 (11,71%) (**)	86 (**)
					Total: 158

3.3.3 Construcción del mapa de ligamiento genético

El mapa de ligamiento (Figura 26) fue construido en el programa MAPMAKER (Lander y col., 1987), usando la función de mapeo de Kosambi (la cual asume interferencias positivas en la meiosis, es decir, considera la probabilidad de existencia de quiasmas cercanos a las regiones de recombinación entre marcadores mapeados a

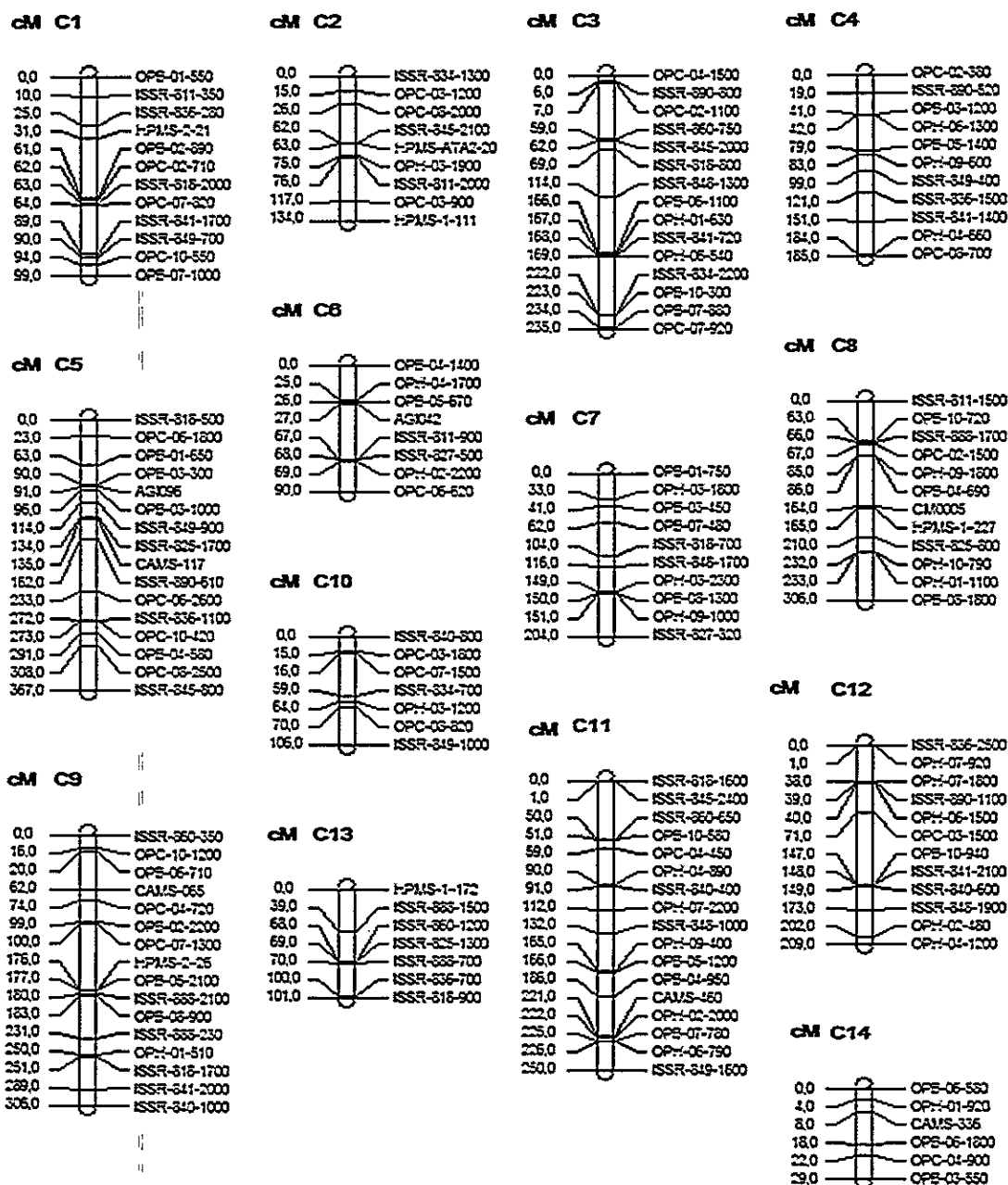


Figura 26 Mapa genético construido en base a marcadores dominantes (ISSR y RAPD) y codominantes (SSR). En total se construyeron 14 grupos de ligamiento (denominados C1, C2, ..., C14) con una distancia promedio de 15,5 centimorgan.

diferencia de otras funciones más básicas de mapeo) y visualizado en el programa WINDOWS QTL CARTOGRAPHER V2.5 (Wang y col., 2007).



El mapa consta de un total de 158 marcadores, de los cuales, como ya se mencionó en la **Tabla X**, 145 corresponden a marcadores dominantes y 13 a marcadores codominantes del tipo SSR. El promedio de distancia de recombinación fue de 15,5 centimorgan (cM), siendo los GL 11, 5 y 3 los que presentaron el mayor tamaño en términos de número de marcadores (17, 16 y 15, respectivamente) y los GL 8, 5 y 7 los que mostraron el mayor tamaño en términos de distancia genética abarcada por sus marcadores (25,5, 22,9 y 20,42 cM respectivamente).

3.3.4 Mapeo de QTLs

3.3.4.1 Método de regresión lineal simple

Los resultados del método de regresión simple se muestran en la **Tabla XI**. Tres marcadores fueron encontrados significativamente ligados a la característica. Estos fueron ISSR-811-350, ISSR-836-280 y HPMS-2-21, son cuales explicaron un 7,17, 16,43 y 19,94% de la variación fenotípica de la resistencia.

Tabla XI Resumen estadístico del método de regresión simple para mapeo de QTL. Solo se muestran los resultados de los marcadores que presentaron ligamiento estadístico con el rasgo de resistencia. La columna encabezada por $2\ln(L0/L1)$ es el test de razón de verosimilitud (LR, por el inglés Likelihood Ratio test), el cual es un método análogo al valor de LOD. Su relación se basa en la ecuación $LOD = 0,217*LR$. pr (F) indica la significancia de β_1 para cada marcador. (*) indica significancia al 5% y (**) indica significancia al 1%. R^2 indica la proporción de variación fenotípica explicada por el QTL (GL: Grupo de ligamiento).

GL	Marcador	β_0	β_1	$2\ln(L0/L1)$	pr (F)	R^2
1	ISSR-811-350	1,627	0,481	14,87	0,000127111 *	0,0717
1	ISSR-836-280	1,66	0,774	35,888	0,000000003 **	0,1643
1	HPMS-2-21	1,636	0,863	44,483	0,000000000 **	0,1994

3.3.4.2 Método de Mapeo por Intervalo Compuesto (MIC)

El MIC, después de 500 permutaciones de análisis, dejó en evidencia una región en el cromosoma 1 (Figura 27) controlando al rasgo de resistencia. Otro pico menor puede ser visualizado en el cromosoma 12.

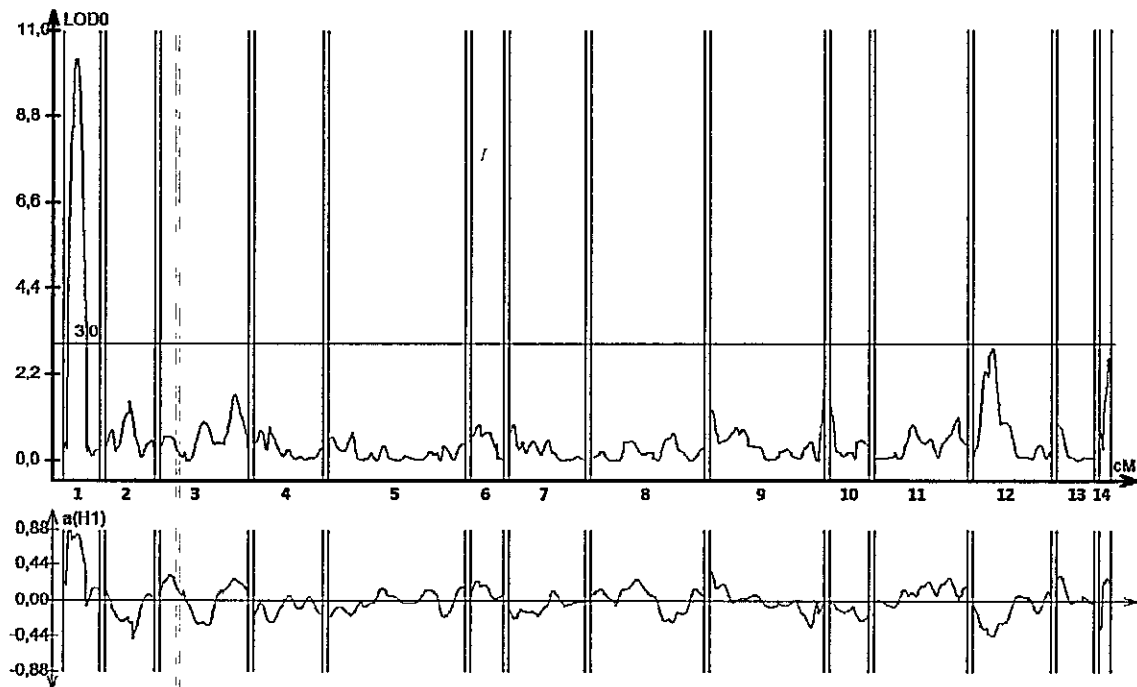


Figura 27 Modelamiento de la probabilidad de ligamiento entre regiones cromosómicas y resistencia a *P. capsici* a través de los 14 GL construidos. La línea horizontal roja marca el valor de LOD umbral (LOD = 3) que se estableció para confirmar la hipótesis de asociación. El gráfico inferior detalla el efecto aditivo del QTL, confirmando que se trata de un QTL de resistencia.

La Figura 28 muestra un detalle del QTL encontrado en el cromosoma 1. La región tiene un máximo valor de LOD cercano a 10 y contiene dentro de sí a los marcadores ISSR-811-350, ISSR-836-280 y HPMS-2-21. La región se extiende por 49 cM, entre las distancias 10 y 59.

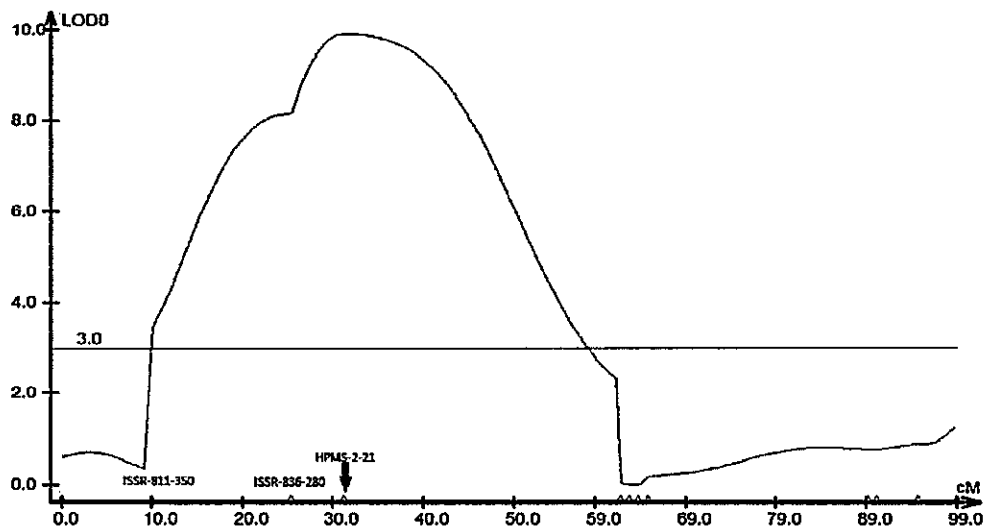


Figura 28 Detalle de una región QTL del GL 1 mapeada en este estudio. Sobre el eje X se muestran los tres marcadores dentro del QTL. La línea roja horizontal marca el umbral de probabilidad para determinar la asociación entre la región cromosómica y la resistencia, además de delimitar la extensión del QTL.

4 DISCUSIÓN

4.1 Análisis de divergencia genética entre 57 accesiones de *C. annuum*

Los resultados generados a partir de la amplificación de doce regiones SSR para el análisis de divergencia genética en 57 accesiones de *C. annuum* arrojaron un número promedio de alelos por locus SSR analizado de 3,58, superior a lo mostrado en otros estudios de caracterización y determinación de diversidad genética en germoplasma de *C. annuum*, en los cuales se han presentado promedios de 3,04 (Rai y col., 2013) y 2,78 (Dhaliwal y col., 2014). Respecto a la selección del método de agrupamiento, el coeficiente de correlación cofenética (CCC) arrojó un valor de 0,82 para el método NJ, superior al presentado para el método UPGMA cuyo CCC fue de 0,76. Sin embargo, ambos valores son considerados como muy bueno y bueno, respectivamente, por diferentes autores (Martinez-Falero 1995; Ghasemi y col., 2014), por lo tanto, los dos métodos de agrupamiento se muestran óptimos para ajustar la distancia genética original con la distancia cofenética proveniente de los potenciales dendrogramas.

En el dendrograma de relaciones genéticas fue posible distinguir tres grupos: Un grupo denominado como Grupo 1 el cual agrupa todas las accesiones de tipo ají, además de las accesiones FINITA y PHYTOSUN (entre otras accesiones tipo pimiento). El segundo grupo (Grupo 2) se conformó solamente por accesiones tipo pimiento, donde se encuentran las accesiones RESISTANT, CALIFORNIA WONDER y TAMBORA. En el último grupo (Grupo 3) se encuentra la accesión comercial FYUCO y el material parental susceptible PIM 677. Estos resultados concordaron con

evaluaciones fenotípicas de rasgos frutales de estas accesiones (peso fresco, porcentaje de materia seca, diámetros polares y ecuatoriales, grosor de pericarpio y grados Brix; datos no mostrados en esta discusión), existiendo una relación entre los grupos y la distribución de las características fenotípicas medidas. Por ejemplo, el Grupo 2 presentó los mayores valores de diámetro ecuatorial, peso fresco y diámetro ecuatorial, mientras que el grupo 3 presentó los más altos valores de °Brix y diámetro polar, y, por último, el grupo 1 destacó en % de materia seca, por lo cual el agrupamiento genético generado por los marcadores SSR concuerda con rasgos fenotípicos de interés agronómico evaluados previamente.

La divergencia genética existente entre los materiales resistentes a *P. capsici* podría suponer la existencia de fuentes genéticas variables de resistencia y la posibilidad de emplear esta variabilidad para maximizar la probabilidad de encontrar marcadores polimórficos entre parentales en la construcción de mapas genéticos. Noir y col. (2003), quienes identificaron un QTL de efecto mayor controlando la resistencia a *Meloydogine exigua* en *Coffea arabica*, afirman que el hecho de que los parentales susceptibles y resistentes utilizados en el estudio tuviesen una divergencia genética baja, limita las posibilidades de implementar otras metodologías de mapeo de QTLs, como por ejemplo, el método Bulk-segregant analysis (BSA). Por otro lado, Hall y col. (2006) analizaron el número de QTLs para rasgos florales en *Mimulus guttatus*, encontrando que en cruza interespecíficas pudieron ser detectados 24 QTLs, en contraste con los 16 QTLs mapeados en un cruzamiento intraespecífico. Esto indica que el uso de parentales divergentes maximiza la probabilidad de encontrar marcadores ligados a una característica producto de una mayor variación alélica entre parentales.

Otro punto importante a destacar relativo a la distribución de genotipos resistentes y susceptibles a través de diferentes grupos genéticos es la posibilidad de explotar una potencial heterosis de la característica (la heterosis definida como el fenómeno genético en el cual el promedio de un híbrido F_1 para una característica estudiada es superior al promedio de las líneas puras parentales para esa característica), debido a que se ha comprobado ampliamente una relación directa entre la divergencia genética entre parentales y el efecto heterótico (Yadav y col., 2007; Lima Gouvea y col., 2010; Du y col., 2011). A pesar de que la heterosis de la resistencia a *P. capsici* en *C. annuum* no ha sido aún documentada, la existencia de heterosis para resistencia a otros patógenos en varias especies se ha verificado ampliamente (Shashikumar y col., 2011; Singh y col., 2012; Chrprová y col., 2013), incluyendo resistencia a *Phytophthora infestans* en papa (Kumar y col., 2007), sugiriendo la posibilidad de explotar este parámetro en futuros programas de cruzas dirigidas para introgresión de la características en híbridos comerciales.

4.2 Las variables fisiológicas analizadas presentan una alta intercorrelación

Los resultados relacionados con las mediciones de eficiencia fotosintética (F_v/F_m), contenido de clorofilas, asimilación neta (A_n), conductancia estomática (g_s), contenido de H_2O_2 , peroxidación lipídica (MDA) y escala de daño en sus últimos tiempos de medición, mostraron una alta correlación entre ellos, como se aprecia en el gráfico del ACP. Esto se ve reflejado en el alto porcentaje de variación de los datos que explica el primer componente (96,6%), relegando al segundo componente solo con un 2,8%. Los datos indican una alta correlación positiva entre las variables F_v/F_m ,

contenido de clorofilas, A_n y g_s , conjunto de datos que a su vez se correlaciona negativamente con el contenido de H_2O_2 , MDA y nivel de daño.

4.2.1 La resistencia y susceptibilidad a *P. capsici* se vieron directamente relacionadas a procesos de cierre estomático y asimilación de CO_2

Como se mencionó anteriormente, el modo de infección de *P. capsici* corresponde a una infección vascular. La cantidad de información publicada relacionada a la variación de los parámetros de fluorescencia de clorofila e intercambio gaseoso ante la infección de hongos mediante vía radicular, y posterior colonización vascular es sumamente limitada. Sin embargo, la posible disminución del suministro hídrico desde la raíz a las hojas y el desencadenamiento de respuestas asociadas a interacciones incompatibles planta-patógeno son dos fenómenos conservados y descritos en infecciones vasculares, por lo cual la planta sensa esta limitación hídrica como un estrés por déficit hídrico.

Una respuesta básica inmediata mediada por ABA ante el déficit hídrico es el cierre estomático (Zhu 2002), el cual lleva directamente a la disminución de la conductancia estomática (g_s), causando una disminución de la asimilación de CO_2 (A_n), y con esto, la imposibilidad de llevar a cabo los procesos metabólicos asociados a la síntesis de glucosa en el ciclo de Calvin. Por ejemplo, en el caso de infecciones de plántulas de *Castanea sativa*, *Eucalyptus siberi* y *Fagus sylvatica* con hongos del género *Phytophthora*, se han encontrado disminuciones importantes de la g_s y transpiración. Esos resultados son explicados por los autores como consecuencia de una disminución de la disponibilidad hídrica inducida por la enfermedad y producida por alteración en la capacidad de absorción de agua desde el suelo. Sin embargo, hay

que destacar que autores como Maurel y col. (2001) encontraron que una disminución de la g_s solo se evidenció cuando el daño radicular llegó a un 50-60%, por lo cual un cierre estomático temprano podría ser causado por elicitores propios del género *Phytophthora* (Takemoto y col., 2005; Mishra y col., 2009). Sin embargo, como indica Kaiser (1976), la disminución de los niveles de A_n puede también ser causada por la alteración de enzimas del ciclo de Calvin por parte de la acción de EROs, tales como la fructosa 1,6-bisfosfatasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, ribulosa 5-fosfato quinasa (entre otras) debido a la acción de EROs y al reemplazo de la A_n por la fotorrespiración (Kozaki y Takeba 1996).

Los resultados mostrados en este estudio indican una disminución de la g_s correlacionada positivamente con la A_n y, ambas a su vez, correlacionadas negativamente con el nivel de daño producido por la infección vascular de *P. capsici* en genotipos susceptibles FINITA y PIM 677 (Figura 24), contrario a lo producido por los genotipos resistentes, indicando que el cierre estomático fue un factor gravitante relacionado con la baja asimilación de CO_2 por parte de los genotipos susceptibles.

4.2.2 Genotipos susceptibles muestran una disminución de la eficiencia fotosintética del PSII, contenido de clorofila y una acumulación de H_2O_2 , en contraste a lo mostrado por genotipos resistentes

Como muestran los gráficos de la Figura 18, la eficiencia del PSII, evaluada como la razón de la fluorescencia variable sobre la fluorescencia máxima, presenta las primeras disminuciones por parte de los genotipos susceptibles en el día 7 de medición (genotipo PIM 677). Sin embargo es en el día 14 cuando ambos genotipos susceptibles exhiben bajas significativas del F_v/F_m . Si bien es cierto varios autores señalan que el PSII presenta sistemas eficientes de protección mediante el incremento de la

disipación de energía no radioactiva e incremento de procesos de fotorrespiración (Subrahmanyam y col., 2006), otros autores han verificado una disminución de los valores de F_v/F_m bajo déficit hídrico (Huang y Gao 1999; Miyashita y col., 2005; Utkhao y Yingjajaval 2015) y un aumento de la concentración de EROs (Qiu y col., 2008). Se ha reportado ampliamente que la acumulación de EROs (y la baja capacidad de eliminación de estas moléculas) es capaz de generar daños sobre el aparato fotosintético. Miller y col. (2010) indican que el cierre estomático genera un efecto dramático en el ciclo de Calvin debido al corte del suministro de CO_2 . Debido a esto, el NADPH ve bloqueada su oxidación en la fase regenerativa del ciclo de Calvin (Apel y Hirt 2004). Bajo esas condiciones, Foyer y Noctor (2000) establecen que la cadena transportadora de electrones comienza a sobrereducirse e incrementa la propensión del oxígeno molecular a extraer electrones desde ésta, generando una producción y difusión de EROs, mayoritariamente O_2^- y H_2O_2 .

Otros estudios apuntan a la relación existente entre acumulación de EROs y disminución de la actividad fotosintética producto de la degradación de la proteína D1 del PSII. Debido a que el H_2O_2 presenta una alta vida media (1 ms) en comparación a otras EROS, es capaz de difundir a través de acuaporinas y traslocarse por largas distancias, se ha visto involucrado en el incremento de la tasa de degradación de la proteína D1 (Bhattacharjee, 2005; Sharma y col., 2012).

En este estudio, los resultados indican que los genotipos RESISTANT y PHYTOSUN presentaron, a la hora 96 de medición, una menor acumulación de H_2O_2 la cual fue significativa en comparación a los genotipos FINITA y PIM 677 (Figura 23). Correlacionado con este hecho, el daño lipoperoxidativo se vio aumentado en genotipos susceptibles a la hora 96 (Figura 24), indicando que genotipos resistentes

presentan mecanismos más eficientes sobre la degradación de EROs. Este hecho ha sido documentado en plantas de pimiento inoculadas con *P. capsici*. Koç y col. (2011) inocularon 3 genotipos de pimiento, de los cuales uno era resistente y dos susceptibles. Los resultados provenientes de los días 2, 4 y 6 post inoculación muestran un menor o inexistente aumento de la acumulación de MDA y H₂O₂ en genotipos resistentes, en contraste con los susceptibles. Incluso, para algunas concentraciones de inóculo evaluadas, en genotipos resistentes, los valores de MDA decayeron significativamente entre los días 2 y 4 de medición. Un factor determinante para esta dinámica fue la mayor y más temprana actividad de la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa), la cual ha sido descrita como una enzima clave en la respuesta a estrés biótico (Kim y Hwang 2014). Kim y col. (2014) identificaron el gen PAL proveniente de *Capsicum annuum* (*CaPAL1*). Ellos mostraron que el silenciamiento del gen en plantas de pimiento provocó un aumento significativo de la susceptibilidad ante la infección con cepas virulentas y avirulentas de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (*Xcv*). Además, indujo la acumulación de EROs y ácido salicílico y aumentó la reacción hipersensitiva (muerte celular). Al ser sobreexpresado *CaPAL1* en *Arabidopsis*, las plantas mostraron un aumento de la resistencia ante *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) y *Hyaloperonospora arabidopsidis*, menor crecimiento de *Pst* en hojas, mayor producción inicial de EROs e inducción de genes *PR1*, involucrados directamente en estrés biótico.

Por estas razones, los genotipos resistentes RESISTANT y PHYTOSUN estarían presentando sistemas de defensa que les permite, por una parte limitar el crecimiento e invasión del patógeno y, por otra parte, evitar la acumulación de H₂O₂ y, por consiguiente, disminuir el daño lipoperoxidativo a membranas lipídicas o a

proteínas específicas relacionadas con funciones fotosintéticas (por ejemplo, proteína D1). Sin embargo, son necesarios análisis más específicos para cuantificar los daños mencionados y así confirmar este supuesto.

Respecto a la disminución de los niveles de clorofila en genotipos susceptibles, diferentes estudios han encontrado evidencia contrastante. Por ejemplo, Schnabel y col. (1998) verificaron una disminución del F_v/F_m en plantas inoculadas con *Phytophthora infestans*, pero en ningún caso una disminución del contenido de clorofila. Sin embargo, Jung y col. (2005), encontraron disminuciones en la concentración de clorofilas de hasta un 43,6% entre plantas control y plantas inoculadas con *P. capsici*, resultados similares a los presentados previamente por Aguirreola y col. (1995). El contenido de clorofila también se vio disminuido en plantas de pimiento inoculadas con el hongo vascular *Verticillium dahliae*, las cuales mostraron diferencias significativas entre plantas sanas control y plantas inoculadas, con disminuciones que alcanzaron un 15% y un 40,8% a los días 28 y 33 post inoculación (Goicoechea y col., 2001). La disminución del contenido de clorofila se presenta en las plantas como un mecanismo fotoprotector para evitar la formación excesiva de tripletes de clorofila, los cuales inducen la formación de singletes de oxígeno altamente reactivos (Sakuraba y col., 2014). Sin embargo también se ha documentado ampliamente que esta disminución puede ser generada por daños importantes de la estructura del PSII. En este estudio, genotipos susceptibles FINITA y PIM 677 mostraron una disminución continua de los niveles de clorofila, a diferencia de los genotipos RESISTANT y PHYTOSUN, los cuales nunca disminuyeron su concentración de clorofila a través del tiempo. Considerando además los antecedentes relativos a la acumulación de H_2O_2 y comportamiento del F_v/F_m , la disminución de la

concentración de clorofila parece estar ligada de manera más probable a un daño de componentes importante funcional y/o estructural del PSII que a un sistema de fotoprotección mediado por la degradación de clorofila. Aunque tampoco se puede descartar que la disminución de la clorofila sea causada por una menor síntesis del pigmento bajo situación de estrés (Mishra y Sanwal 1994; Apostolova y Misra 2014).

A pesar de que los resultados de estos análisis se focalizaron como una herramienta en la selección de genotipos resistentes y susceptibles para conformar una población de mapeo genético, las evidencias indican que los genotipos FINITA y PIM 677 exhiben una baja eficiencia en la eliminación de EROs, lo que se ve reflejado directamente en los altos índices de daño lipoperoxidativo, disminución de la capacidad fotosintética del PSII y, probablemente, a un daño de enzimas claves involucradas en los procesos de asimilación de CO₂ y ciclo de Calvin. Por otra parte, los genotipos RESISTANT y PHYTOSUN consiguen mantener un flujo hídrico vascular de raíz a hoja óptimo posterior a la inoculación, lo que les permite conseguir tasas de A_n prácticamente invariables y de esta forma, llevar a cabo los procesos metabólicos posteriores a la captura de CO₂ atmosférico.

4.3 El mapa genético construido presentó 14 grupos de ligamiento

El mapa genético finalmente generado fue construido usando la población F₂ proveniente del cruzamiento inicial entre los genotipos PHYTOSUN (R) y FINITA (S) basado en los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica y fisiológica de los parentales. El mapa constó de 158 marcadores moleculares, distribuidos como informa la **Tabla X** y en la **Figura 26**. Los tres tipos de marcadores moleculares fueron seleccionados debido a que presentan un nivel óptimo de polimorfismo, tanto para

estudios de divergencia como de mapeo genético (mayor que otros como las isoenzimas y RFLP), son de un relativo bajo costo y fáciles de implementar en laboratorio. Como es posible apreciar en la **Tabla X**, existió un bajo porcentaje de alelos con distorsión de segregación (19,54%, 17,02% y 11,71% para los marcadores SSR, ISSR y RAPD, respectivamente). La distorsión de segregación es el fenómeno que ocurre cuando un alelo no segrega en la proporción mendeliana esperada para una población. En este caso, para un marcador codominante como los SSR se espera tasas de segregación AA:Aa:aa en relación a la proporción 1:2:1, mientras que las tasas de segregación para marcadores dominantes se esperan ser 1:1, entre ausencia y presencia de la banda. Las causas para la existencia de loci con distorsión de segregación han sido atribuidas a la relación de estos loci con procesos de selección cigótica y gamética o ligación con regiones transposónicas (Xu, 2008). Debido a su condición de no cumplimiento de los patrones de segregación esperados, estos deben ser removidos previos a la construcción del mapa genético debido a que pueden distorsionar las frecuencias de recombinación de los demás marcadores.

C. annuum consta de 12 pares de cromosomas, por lo que en un escenario óptimo era de esperarse el mismo número de GL. Sin embargo, los 158 marcadores moleculares usados en este estudio se agruparon en 14 GL. Como explica Boopathi (2012), el número de GL obtenidos dependerá de factores como la densidad y proximidad de los marcadores dentro de cada grupo, lo cual es una consecuencia de la co-ascendencia de los parentales, así como de la recombinación local de los marcadores dentro de un cromosoma. Por ejemplo, Minamiyama y col. (2006) construyeron un mapa de ligamiento basado solamente en marcadores SSR, los cuales se agruparon en 13 GL, mientras que otros autores han construido mapas de

ligamiento conformados por 12 grupos (Mimura y col., 2012; Li y col., 2015). Sin embargo, este desvío respecto al número original de cromosomas no tiene mayor repercusión al momento de implementar los modelos de asociación entre los marcadores y la característica.

4.4 Un QTL con alta probabilidad de ligamiento fue detectado en el GL número 1

El método de mapeo por regresión simple se utilizó para acotar la región de búsqueda previo a un análisis más intenso a través de los 14 GL, debido a que es un proceso que toma poco tiempo en términos de computar los análisis en un ordenador. Los resultados mostraron que 3 marcadores (ISSR-811-350; ISSR-836-280 y HPMS-2-21) presentaron una correlación significativa con la característica de resistencia (Tabla XI). Otros marcadores en los cromosomas 3, 4, 6 y 14 también presentaron valores de regresión estadísticamente diferentes a cero. Sin embargo, no fueron considerados para análisis posteriores por presentar valores de LOD bajo el umbral seleccionado en este trabajo (umbral de LOD = 3,0) (datos no mostrados).

Posterior a esto, como se indica en el punto 2.3.4, el GL 1 fue mapeado usando un modelo más complejo de asociación denominado mapeo por intervalo compuesto (MIC), cuyos detalles se mencionan en ese mismo punto. Se realizaron 500 permutaciones del análisis, las cuales tardaron alrededor de 2 minutos por permutación, totalizando cerca de 1000 minutos de análisis. Los resultados del MIC avalaron los resultados mostrados por el análisis de regresión. La región abarcada por el QTL se extiende entre los 10 y los 59 centimorgan (cM), alcanzando su máximo pico

a los 35,01 cM, con un valor LOD = 10,22. Además, los mismos marcadores (ISSR-811-350; ISSR-836-280 y HPMS-2-21) se encuentran dentro de la región del QTL.

La longitud en cM de la región mapeada (49 cM) va a depender de la saturación del mapa de ligamiento con marcadores moleculares y del número de recombinaciones generadas en la población F_2 (180 individuos en este estudio) (Ferreira y col., 2006). Por este motivo se asume que un mayor número de individuos y marcadores analizados generará una mayor cantidad de eventos de recombinación y saturación del mapa, los cuales mejorarán la precisión con la cual los marcadores son distribuidos a través del genoma y la estimación de los valores de probabilidad de asociación entre estos y la característica de interés. Sin embargo, la extensión medida en cM de una región QTL en el genoma está determinada por la naturaleza poligénica de la característica. La acumulación de varios genes de efecto menor influenciado un rasgo a través del genoma llevará inevitablemente a una baja especificidad en el resultado. Por otro lado, la presencia de genes de efecto mayor en una región permitirá acotar la región genómica que abarca el QTL.

Debido a que varios estudios han demostrado la eficacia de utilizar marcadores moleculares en programas de selección y cruza dirigidas (Li y col., 2000; Ashikari y col., 2006; Robbins y col., 2008), los resultados aquí encontrados muestran el potencial de utilizar esta información en el futuro desarrollo de líneas en las cuales se optimicen los procesos de selección mediante el uso de marcadores moleculares.

5 CONCLUSIONES

- La divergencia genética analizada entre 57 accesiones de *C. annuum* muestra un óptimo comportamiento al permitir separar, de manera general en diferentes grupos, genotipos tipo ají y tipo pimiento. Esto se vio reforzado al relacionar variables fenotípicas frutales evaluadas previamente en el Laboratorio de Fisiología y Genética Hortícola con el agrupamiento generado mediante el uso de marcadores SSR.
- La distribución de los genotipos resistentes y susceptibles, a través de los tres grupos generados por el método de agrupamiento NJ, permite evidenciar su grado de divergencia genética, lo cual se presenta como un apoyo en la toma de decisiones en futuros programas de cruza específicas.
- El nivel de daño en las plantas de pimiento, producto de la inoculación con *P. capsici*, se correlacionó fuertemente con las variables fisiológicas evaluadas, indicando que éstas sirven como herramienta de selección de parentales contrastantes para la construcción de una población segregante para mapeo de QTL.
- Los modelos de asociación genética mostraron una alta correlación entre los marcadores del grupo de ligamiento 1 ISSR-811-350, ISSR-836-280 y HPMS2-21 y la resistencia a *P. capsici*, lo cual valida los modelos de asociación utilizados y permite proyectar un potencial uso en programas de selección y cruzamientos asistidos por marcadores moleculares.
- Basado en los resultados del objetivo específico 4, relacionado con el mapeo de QTL, es posible corroborar la hipótesis planteada en este trabajo.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Agati G, Cerovic ZG, Dalla Marta A, Di Stefano V, Pinelli P, Traversi ML y Orlandini S.** 2008. Optically-assessed preformed flavonoids and susceptibility of grapevine to *Plasmopara viticola* under different light regimes. *Functional plant biology* 35 (1):77-84
- Aguiar JL, Bachie O y Ploeg A.** 2014. Response of Resistant and Susceptible Bell Pepper (*Capsicum annuum*) to a Southern California *Meloidogyne incognita* Population from a Commercial Bell Pepper Field. *Journal of nematology* 46 (4):346
- Aguirreolea J, Irigoyen J, Sánchez-Díaz M y Salaverri J.** 1995. Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit. *Plant Pathology* 44 (3):587-596
- Ajithkumar K, Savitha A, Biradar S, Rajanna B y Ramesh G.** 2014. Management of powdery mildew and anthracnose diseases of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Pest Management In Horticultural Ecosystems* 20 (1):80-83
- Allardyce JA, Rookes JE y Cahill DM.** 2012. Defining plant resistance to *Phytophthora cinnamomi*: a standardized approach to assessment. *Journal of phytopathology* 160 (6):269-276
- Andrews JP.** 1995. *The domesticated Capsicums*. New edition Austin: University of Texas
- Apel K, Hirt H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399
- Apostolova EL y Misra A.** 2014. Alterations in structural organization affect the functional ability of photosynthetic apparatus. *Handbook of Plant and Crop Physiology*, expanded third ed, CRC Press, Taylor & Francis Group:103-120
- Ashikari M y Matsuoka M.** 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *Trends in plant science* 11 (7):344-350
- Baron M, Flexas J y Delucia EH.** 2012. Photosynthetic responses to biotic stress. En Flexas J, Loreto F, Medrano H (2012) *Terrestrial photosynthesis in a changing environment: A molecular, physiological and ecological approach*.
- Berger S, Sinha AK y Roitsch T.** 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of experimental botany* 58 (15-16):4019-4026
- Bhattacharjee S.** 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal. *Curr Sci* 89:1113-1121
- Bonnet J, Danan S, Boudet C, Barchi L, Sage-Palloix A-M, Caromel B, Palloix A y Lefebvre V.** 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theor Appl Genet* 115 (2):253-264
- Boopathi NM.** 2012. *Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits*. Springer Science & Business Media,

- Bosland P y Votava E.** 2000. Peppers: Vegetable and spice capsicums. Crop production science in Horticulture Series No. 12. 204Wallingford,, UK: CABI Publishing
- Candole BL, Conner PJ, McGregor C, Waters V y Ji P.** 2012. The disease reactions of heirloom bell pepper "California Wonder" to *Phytophthora capsici*. *Agricultural Sciences* 3 (03):417
- Chaim A, Borovsky Y, De Jong W y Paran I.** 2003. Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10. 1, a major fruit-shape QTL in pepper. *Theor Appl Genet* 106 (5):889-894
- Chen Sx y Schopfer P.** 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *European Journal of Biochemistry* 260 (3):726-735
- Choi J, Phat C, Kim E, Kim M, Lee G, Ryu K-H y Lee C.** 2015. Improved detection of Cucumber mosaic virus coat protein (CMV-CP) in genetically modified pepper (*Capsicum annuum*) using a polyclonal antibody to a synthetic CP peptide. *Hortic Environ Biotechnol* 56 (3):316-323. doi:10.1007/s13580-015-0139-5
- Chrpová J, Šíp V, Štočková L y Stehno Z** Sources of resistance to Fusarium head blight for wheat breeding and growing. In: Tagungsband der 64. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 25-26 November. 2013. Raumberg-Gumpenstein, Österreich. Mutagenese und Hochdurchsatz-Screening: CORNET Projekte., 2013. Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Raumberg-Gumpenstein, pp 63-67
- Dhaliwal M, Yadav y Jindal S.** 2014. Molecular characterization and diversity analysis in chilli pepper using simple sequence repeats (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 13 (31):3137-3143
- Don R, Cox P, Wainwright B, Baker K y Mattick J.**1991. 'Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research* 19 (14):4008
- Du X, Sun Y, Li X, Zhou J y Li X.**2011. Genetic divergence among inbred lines in *Cucurbita moschata* from China. *Scientia Horticulturae* 127 (3):207-213
- Eshbaugh WH.** 2012. 2 The Taxonomy of the Genus Capsicum. Peppers: Botany, Production and Uses:14
- Ezziyani M, Sánchez CP, Requena ME, Ahmed AS y Castillo MEC.** 2004. Evaluación del biocontrol de "*Phytophthora capsici*" en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con "*Burkholderia cepacia*". In: *Anales de Biología*, 2004. vol 26. Facultad de Biología, pp 61-68
- FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Sitio web: http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/*E . Consultado día 18 de septiembre de 2015.
- Fazari A, Palloix A, Wang L, Yan Hua M, Sage-Palloix AM, Zhang BX y Djian-Caporalino C.** 2012. The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant breeding* 131 (5):665-673
- Fernández C.** 1983. *Phytophthora capsici* causante de la marchitez en pimiento (*Capsicum annuum*) en Chile. *Agricultura técnica* 43 (2):91-93

- Ferreira A, Silva MFD y Cruz CD.** 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology* 29 (1):187-192
- Fleischmann F, Koehl J, Portz R, Beltrame A y Oßwald W.** 2005. Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor "citricolin" to pathogenesis. *Plant Biology* 7 (6):650-658
- Foyer CH y Noctor G.** 2000. Tansley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*:359-388
- Ghasemi AR, Golparvar AR y Isfahani MN.** 2014. Analysis of genetic diversity of sugar beet genotypes using random amplified polymorphic DNA marker. *Genetika* 46 (3):975-984
- Goicoechea N, Aguirreolea J, Cenoz S y Garcia-Mina J.** 2001. Gas exchange and flowering in *Verticillium*-wilted pepper plants. *Journal of Phytopathology* 149 (5):281-286
- Hall MC, Basten CJ y Willis JH.** 2006. Pleiotropic quantitative trait loci contribute to population divergence in traits associated with life-history variation in *Mimulus guttatus*. *Genetics* 172 (3):1829-1844
- Hausbeck MK y Lamour KH.** 2004. *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops: Research Progress and Management Challenges. *Plant Disease* 88 (12):1292-1303
- Herrera R, Cares V, Wilkinson M y Callgarí P.** 2002. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. *Euphytica* 124 (1):139-145
- Huang B y Gao H.** 1999. Physiological responses of diverse tall fescue cultivars to drought stress. *HortScience* 34 (5):897-901
- Hückelhoven R.** 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45:101-127
- Hunziker A.** 2001. *The Genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System*, Gantner, ARG. Ruggell:500
- Hwang BK y Kim CH.** 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant disease (USA)*
- Ince AG, Karaca M y Onus AN.** 2010. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. *Plant molecular biology reporter* 28 (2):285-291
- Inoue-Nagata AK, Fonseca MEN, Resende RO, Boiteux LS, Monte DC, Dusi AN, de Ávila AC y van der Vlugt RAA.** 2002. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Arch Virol* 147 (4):849-855. doi:10.1007/s007050200032
- Johnstone M, Chatterton S, Sutton J y Grodzinski B.** 2005. Net carbon gain and growth of bell peppers, *Capsicum annuum* 'Cubico', following root infection by *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 95 (4):354-361

- Jung W-J, Jin Y-L, Kim Y-C, Kim K-Y, Park R-D y Kim T-H.** 2004. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the Isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biological Control* 30 (3):645-652
- Jung WJ, Jin YL, Kim KY, Park RD y Kim TH.** 2005. Changes in pathogenesis-related proteins in pepper plants with regard to biological control of phytophthora blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *BioControl* 50 (1):165-178
- Kaiser W.** 1976. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 440 (3):476-482
- Kim DS y Hwang BK.** 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of experimental botany:eru109*
- Koç E, Üstün AS, İşlek C y Arıcı YK.** 2011. Defence responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 128 (4):434-442
- Koch C, Noga G y Strittmatter G.** 1994. Photosynthetic electron transport is differentially affected during early stages of cultivar/race-specific interactions between potato and *Phytophthora infestans*. *Planta* 193 (4):551-557
- Kozaki A y Takeba G.** 1996. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation.
- Kumar R, Kang G y Pandey S.** 2007. Inheritance of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in potato. *Euphytica* 155 (1-2):183-191
- Lamour KH, Stam R, Jupe J y Huitema E.** 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular plant pathology* 13 (4):329-337
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE y Newburg L.** 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 (2):174-181
- Lee H-R, Bae I-H, Park S-W, Kim H-J, Min W-K, Han J-H, Kim K-T y Kim B-D.** 2009. Construction of an integrated pepper map using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC end sequences. *Molecules and cells* 27 (1):21-37
- Lee J, Nahm S, Kim Y y Kim B.** 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor Appl Genet* 108 (4):619-627
- Lefebvre V, Daubèze AM, Rouppe van der Voort J, Peleman J, Bardin M y Palloix A.** 2003. QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theor Appl Genet* 107 (4):661-666. doi:10.1007/s00122-003-1307-z
- Lefebvre V, Pflieger S, Thabuis A, Caranta C, Blattes A, Chauvet J-C, Daubèze A-M y Palloix A.** 2002. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45 (5):839-854

- Leonian LH.** 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology* 12 (9):401-408.
- Li W, Cheng J, Wu Z, Qin C, Tan S, Tang X, Cui J, Zhang L y Hu K.** 2015. An InDel-based linkage map of hot pepper (*Capsicum annuum*). *Molecular Breeding* 35 (1):1-10
- Li Z, Shen L, Courtois B y Lafitte R.** 2000. Development of Near Isogenic Introgression Line (NIL) Sets for QTLs Associated with Drought Tolerance in Rice. *Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-Limited Environments*:103
- Lichtenthaler HK y Buschmann C.** 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*
- Lima Gouvea LR, Rubiano LB, Chioratto AF, Zucchi MI y Gonçalves PdS.** 2010. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 33 (2):308
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, Van Wijk R y Jahn MK.** 1999. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics* 152 (3):1183-1202
- Lu F-H, Kwon S-W, Yoon M-Y, Kim K-T, Cho M-C, Yoon M-K y Park Y-J.** 2012. SNP marker integration and QTL analysis of 12 agronomic and morphological traits in F8 RILs of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and cells* 34 (1):25-34
- Madeira AC, Ferreira A, de Varennes A y Vieira MI.** 2003. SPAD meter versus tristimulus colorimeter to estimate chlorophyll content and leaf color in sweet pepper. *Communications in soil science and plant analysis* 34 (17-18):2461-2470
- Manter DK, Kelsey RG y Karchesy JJ.** 2007. Photosynthetic declines in *Phytophthora ramorum*-infected plants develop prior to water stress and in response to exogenous application of elicitors. *Phytopathology* 97 (7):850-856
- Martinez-Falero E.** 1995. Quantitative techniques in landscape planning. CRC Press,
- Maurel M, Robin C, Capdevielle X, Loustau D y Desprez-Loustau M-L.** 2001. Effects of variable root damage caused by *Phytophthora cinnamomi* on water relations of chestnut saplings. *Annals of forest science* 58 (6):639-651
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S y Mittler R.** 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment* 33 (4):453-467
- Mimura Y, Inoue T, Minamiyama Y y Kubo N.** 2012. An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding science* 62 (1):93
- Minamiyama Y, Tsuro M y Hirai M.** 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular breeding* 18 (2):157-169

- Mishra AK, Sharma K y Misra RS.** 2009. Purification and characterization of elicitor protein from *Phytophthora colocasiae* and basic resistance in *Colocasia esculenta*. *Microbiological research* 164 (6):688-693
- Mishra S y Sanwal G.** 1994. Effect of *Cuscuta* infection on chloroplast lipid composition of Brassica leaves. *European journal of Plant pathology* 100 (1):61-70
- Miyashita K, Tanakamaru S, Maitani T y Kimura K.** 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and experimental botany* 53 (2):205-214
- Mongkolporn O y Taylor PW.** 2011. *Capsicum*. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer, pp 43-57
- Morales RGF, Resende JTV, Faria MV, Andrade MC, Resende LV, Delatorre CA y Silva PRd.** 2011. Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Scientia Agricola* 68 (6):665-670
- Moreira S, Rodrigues R, Sudré C y Riva-Souza E.** 2015. Bacterial spot resistance and agronomic characteristic in *Capsicum annum* recombinant inbred lines. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 10 (2):198-204
- Moreno-Chacón AL, Camperos-Reyes JE, Diazgranados RAÁ y Romero HM.** 2013. Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Physiology and Biochemistry* 70:246-251
- Moscone EA, Scaldaferrro MA, Grabielle M, Cecchini NM, Sánchez García Y, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE, Ehrendorfer F.** 2006. The evolution of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*): a cytogenetic perspective. In: *VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity* 745, 2006. pp 137-170
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H y Prats E.** 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of experimental Botany* 59 (3):501-520
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y y Allakhverdiev SI.** 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1767 (6):414-421
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Yamamoto H, Hayashi H y Murata N.** 2004. Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43 (35):11321-11330
- Nogués S, Cotxarrera L, Alegre L y Trillas MI.** 2002. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist* 154 (2):461-470
- Noir S, Anthony F, Bertrand B, Combes MC y Lashermes P.** 2003. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52 (1):97-103

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Sitio web: <http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/> . Consultado día 18 de septiembre de 2015

Oerke E-C y Dehne H-W. 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop protection* 23 (4):275-285

Ogundiwin EA, Berke TF, Massoudi M, Black LL, Huestis G, Choi D, Lee S y Prince JP. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 48 (4):698-711

Paran I, Ben-Chaim A, Kang B-C y Jahn M. 2007. *Capsicums*. In: *Vegetables*. Springer, pp 209-226

Park C-J, Shin Y-C, Lee B-J, Kim K-J, Kim J-K y Paek K-H. 2006. A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris*. *Planta* 223 (2):168-179

Park S, Jeong WY, Lee JH, Kim Y-H, Jeong SW, Kim G-S, Bae DW, Lim C-S, Jin JS y Lee SJ. 2012. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 130 (4):981-985

Peterson PA. 1959. Linkage of fruit shape and color genes in *Capsicum*. *Genetics* 44 (3):407

Pickersgill B. 1977. Chromosomes and evolution in *Capsicum*. *Capsicum* 77

Pochard E. 1977. Localization of genes in *Capsicum annuum* L. by trisomic analysis. In: *Annales de l'amélioration des plantes*

Pozzobon MT, Schifino-Wittmann MT y De Bem Bianchetti L. 2006. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society* 151 (2):259-269

Qiu Z-B, Liu X, Tian X-J y Yue M. 2008. Effects of CO₂ laser pretreatment on drought stress resistance in wheat. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 90 (1):17-25

Quirin E, Ogundiwin E, Prince J, Mazourek M, Briggs M, Chlanda T, Kim K, Falise M, Kang B y Jahn M. 2005. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto. 5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. *Theor Appl Genet* 110 (4):605-612

Rai VP, Kumar R, Kumar S, Rai A, Kumar S, Singh M, Singh SP, Rai AB y Paliwal R. 2013. Genetic diversity in *Capsicum* germplasm based on microsatellite and random amplified microsatellite polymorphism markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19 (4):575-586

RedAgricola. Sitio web: (<http://www.redagricola.com/reportajes/hortalizas/pimientos-y-ajies-hortalizas-de-alto-valor-funcional-para-el-mercado-fresco-y->). Consultado día 18 de septiembre de 2015

Robbins MD, Casler MD y Staub JE. 2008. Pyramiding QTL for multiple lateral branching in cucumber using inbred backcross lines. *Molecular breeding* 22 (1):131-139

- Rubio M, Caranta C y Palloix A.** 2008. Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the *pvr2-elF4E* locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 51 (9):767-771. doi:10.1139/G08-056
- Sakuraba Y, Lee S-H, Kim Y-S, Park OK, Hörtensteiner S y Paek N-C.** 2014. Delayed degradation of chlorophylls and photosynthetic proteins in *Arabidopsis* autophagy mutants during stress-induced leaf yellowing. *Journal of experimental botany:eru008*
- Saraçlı S, Doğan N y Doğan İ.** 2013. Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. *Journal of Inequalities and Applications* 2013 (1):1-8
- Schnabel G, Strittmatter G y Noga G.** 1998. Changes in photosynthetic electron transport in potato cultivars with different field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Journal of Phytopathology* 146 (5-6):205-210
- Segal AW.** 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (4):604-618
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS y Pessarakli M.** 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012
- Shashikumar KT, Pitchaimuthu M, Kumar DP y Rawal RD.** 2011. Heterosis and combining ability for resistance to powdery mildew in adult melon plants. *Plant breeding* 130 (3):383-387
- Singh DK, Kumar K y Singh P.** 2012. Heterosis and heritability analysis for different crosses in *Brassica juncea* with inheritance of white rust resistance. *Journal of Oilseed Brassica* 3 (1):18-26
- Subrahmanyam D, Subash N, Haris A y Sikka A.** 2006. Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. *Photosynthetica* 44 (1):125-129
- Sun C, Mao SL, Zhang ZH, Palloix A, Wang LH y Zhang BX.** 2015. Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of *Capsicum* mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. *Scientia Horticulturae* 181:81-88
- Sun W, Jia Y, O'Neill N, Feng B y Zhang X.** 2008. Genetic diversity in *Phytophthora capsici* from eastern China. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30 (3):414-424
- Takemoto D, Hardham AR y Jones DA.** 2005. Differences in cell death induction by *Phytophthora* elicitors are determined by signal components downstream of MAP kinase kinase in different species of *Nicotiana* and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Plant physiology* 138 (3):1491-1504
- Tanksley SD.** 1984. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma* 89 (5):352-360
- Tewksbury JJ, Manchego C, Haak DC y Levey DJ.** 2006. Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *Journal of chemical ecology* 32 (3):547-564

- Tewksbury JJ y Nabhan GP.** 2001. Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature* 412 (6845):403-404
- Thabuis A, Palloix A, Pflieger S, Daubeze A-M, Caranta C y Lefebvre V.** 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theor Appl Genet* 106 (8):1473-1485
- Thabuis A, Palloix A, Servin B, Daubeze A, Signoret P y Lefebvre V.** 2004. Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. *Molecular Breeding* 14 (1):9-20
- Utkhao W y Yingjajaval S.** 2015. Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. *Trees*:1-12
- Valenzuela GM, Juárez ER, Prieto JC y Soriano EC.** 2002. Detección y localización de *Phytophthora capsici* leo. en semilla de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20 (1):94-97
- Velikova V, Yordanov I y Edreva A.** 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151 (1):59-66
- Walsh BM y Hoot SB.** 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 (6):1409-1418
- Wang S, Basten C y Zeng Z.** 2007. Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC
- Xu S.** 2008. Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. *Genetics* 180 (4):2201-2208
- Yadav H, Shukla S y Singh S.** 2007. Genetic divergence in parental genotypes and its relation with heterosis, F1 performance and general combining ability (GCA) in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Euphytica* 157 (1-2):123-130
- Yang H-B, Liu WY, Kang W-H, Jahn M y Kang B-C.** 2009. Development of SNP markers linked to the L locus in Capsicum spp. by a comparative genetic analysis. *Molecular breeding* 24 (4):433-446
- Yao M, Li N, Wang F y Ye Z.** 2013. Genetic analysis and identification of QTLs for resistance to cucumber mosaic virus in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 193 (2):135-145. doi:10.1007/s10681-013-0953-8
- Yao Q, Yang K, Pan G y Rong T.** 2007. Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) landraces from Southwest China based on SSR data. *Journal of genetics and genomics* 34 (9):851-860
- Zhang Y, Li D, Gong Z, Wang J, Yin Y y Ji J.** 2013. Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). *Genet Mol Res* 12:3605-3621

Zhu J-K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual review of plant biology
53:247

7 ANEXOS

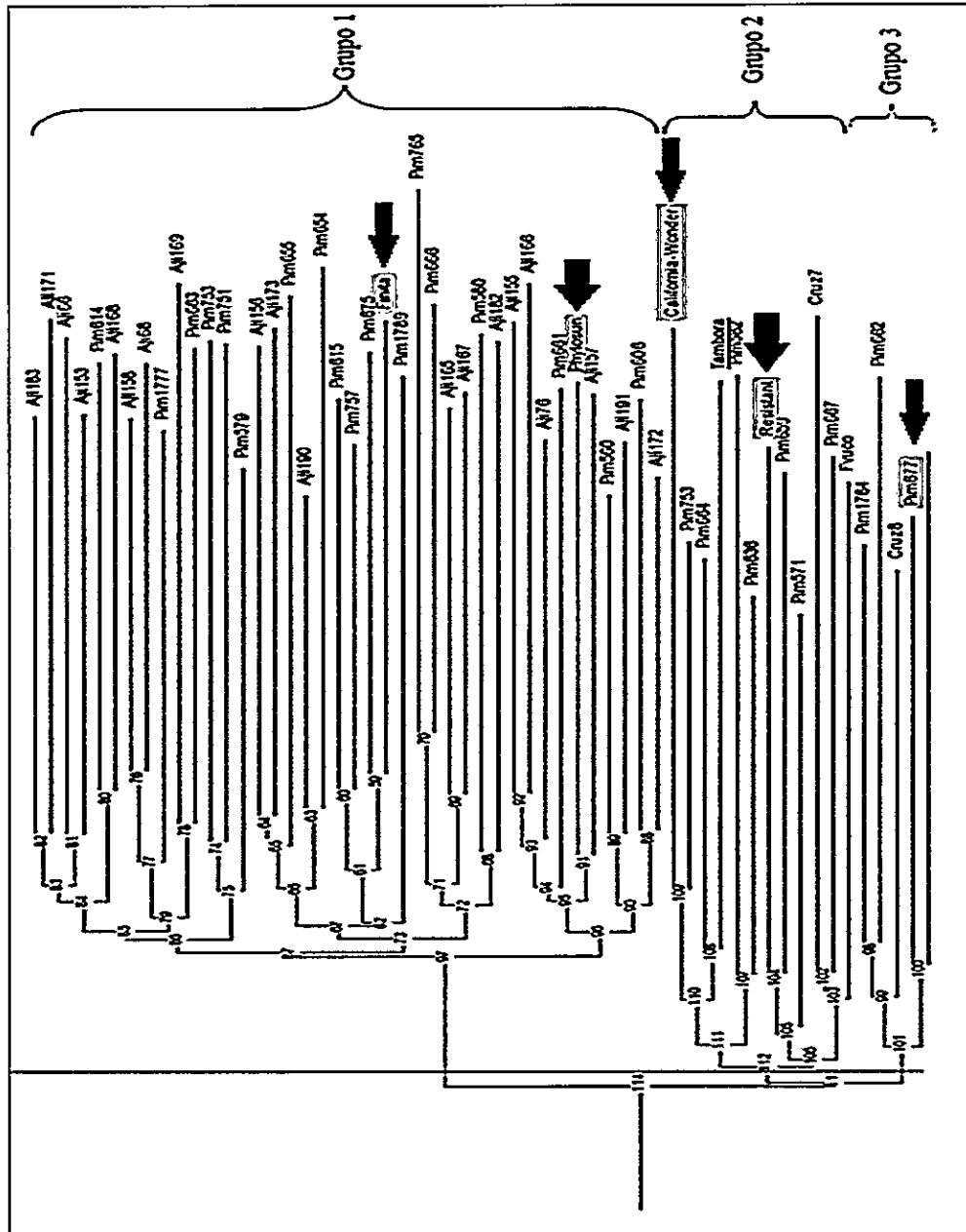


Figura 29 Dendrograma generado en base a la distancia genética de Yao, utilizando el método de agrupamiento NJ. Tres grupos genéticos pueden ser diferenciados. En rectángulo se enmarcan los genotipos comerciales de pimienta, a excepción de la accesión PIM 677. Enmarcados en amarillo y señalados con flecha azul se presentan los genotipos susceptibles a

P. capsici usados en este estudio, mientras que enmarcados en marrón y señalados con una flecha color rojo se presentan los genotipos resistentes a *P. capsici* utilizados.



Figura 30 Niveles de daño producido por la inoculación por *P. capsici* (conocido comúnmente como marchitez o tristeza del pimiento) en los cuatro genotipos a través de 4 tiempos de medición. El nivel de daño, basado en la escala visual, se presenta en la esquina inferior izquierda de cada fotografía. La misma escala visual fue utilizada para el fenotipado de la población F_2 a fin de mapear QTL.