



FACULTADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA
VEXETAL E ECOLOXÍA

Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia.

TRABAJO FIN DE MÁSTER
Diego Marcos Pérez
Enero 2013

Agradecimientos:

A los Doctores Federico Pomar Barbeito y Cristina Silvar Pereiro por su excelente dirección en la realización de este Trabajo Fin de Máster y por el apoyo y el trato prestado en todo momento.

A todas las personas que forman parte del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidade da Coruña por haberme ayudado en todo lo que he necesitado y por el buen trato recibido siempre.

A mis padres y mi hermano por estar siempre ahí, apoyándome y animándome en todo lo que haga.

A mi novia por entenderme y escucharme cada día.

Trabajo de Máster: Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia.

D. FEDERICO POMAR BARBEITO, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, Y
Dña. CRISTINA SILVAR PEREIRO, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR, DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEXETAL E
ECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de Máster titulado "Caracterización molecular y análisis de diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia", presentado por el licenciado DIEGO MARCOS PÉREZ ha sido realizado en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía de la Universidade da Coruña bajo su dirección, y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Máster de Biotecnología Avanzada, por lo que autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, expiden y firman el presente certificado en A Coruña, a 21 de Enero de 2013.

Fdo. Federico Pomar Barbeito

Fdo. Cristina Silvar Pereir

1. Introducción

- 1.1 Botánica del género *Capsicum*
- 1.2 Origen y domesticación del pimiento
- 1.3 Citogenética del género *Capsicum*
- 1.4 Producción y usos del pimiento
- 1.5 Importancia de los recursos fitogenéticos
- 1.6 Marcadores moleculares
- 1.7 Microsatélites

2. Objetivos

3. Materiales y Métodos

- 3.1 Material vegetal
- 3.2 Análisis de los caracteres agromorfológicos
- 3.3 Extracción de ADN
- 3.4 Selección de los marcadores SSR (Microsatélites)
- 3.5 Amplificación mediante PCR y detección en analizador genético
- 3.6 Análisis de resultados

4. Resultados y Discusión

- 4.1 Caracterización agromorfológica
 - 4.1.1 Caracteres cualitativos
 - 4.1.2 Caracteres cuantitativos
- 4.2 Análisis de los datos moleculares
 - 4.2.1 Optimización de la metodología de marcaje M13
 - 4.2.2 Polimorfismo e índices de diversidad
 - 4.2.3 Análisis de clúster
 - 4.2.4 Análisis de coordenadas principales

5. Conclusiones

6. Bibliografía

7. Anexos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Botánica del género *Capsicum*

Todas las variedades de pimiento utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. El nombre científico de este género deriva del griego, existiendo dos versiones que explican el origen etimológico del mismo; para algunos autores deriva de kapso (picar), mientras que para otro grupo de autores, el género proviene de la palabra kapsakes (cápsula). Este género se incluye dentro de la extensa familia de las solanáceas en la cual están incluidas otras hortalizas tales como la patata, el tomate o las berenjenas. Actualmente esta familia está compuesta por más de 90 géneros, los cuales se encuentran divididos entre dos subfamilias: *Solanoideae* y *Cestroideae*, estando el género *Capsicum* incluido en la primera de ellas, *Solanoideae*.

Reino: Eucariota

División: *Spermatophyta*

Línea XIV: *Angiospermae*

Clase A: *Dicotyledones*

Rama 2: Malvales-Tubiflorae

Orden XXI: *Solanales (Personatae)*

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Género: *Capsicum*

Dentro del género *Capsicum* existen unas 30 especies; sin embargo, las principales especies cultivadas por el hombre son sólo cinco: *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* Ruiz-Pavón. De todas estas, *Capsicum annuum* L. es la especie más cultivada y con mayor importancia económica, presentando variedades picantes y no picantes (o también llamadas “dulces”).

Las distintas especies del género *Capsicum*, pueden ser taxonómicamente clasificadas según la constricción del cáliz, el número de flores por nudo, el color de sus flores, etc. De esta manera, según el color de sus flores se pueden diferenciar dos grupos: un grupo de especies con flores blancas, dentro del cual estarían *C. annuum* L.,

C. baccatum L., *C. frutescens* L. y *C. chinense* Jacq. y las especies no domesticadas *C. chacoense* A.T. Hunz. *C. galapagoense* A.T. Hunz y *C. praetermissum* Heiser & Smith. El grupo de las plantas con flor púrpura incluye una especie domesticada (*C. pubescens* R. & P.) y tres especies no domesticadas (*C. eximium* A.T Hunz, *C. cardenassi* Heiser & Smith, y *C. tovarii* Eshbaugh, Smith & Nickrent).

1.2 Origen y domesticación del pimiento

El pimiento es una planta originaria de América, la cual se conocía y consumía antes del establecimiento de la agricultura, alrededor del año 7000 a.C., como se demostró mediante la identificación de restos arqueológicos del valle de Tehuacan, al sudeste de México (Pickersgill, 1969). McLeod *et al.* (1983) propone que *C. chacoense*, o un ancestro suyo, pudo dar origen a *C. baccatum*, durante la migración hacia la cuenca del Amazonas, y a *C. eximium*, en la migración a tierras altas de los Andes. A su vez, *C. baccatum* pudo dar lugar a *C. tovarii* y al complejo *C. annuum*, que incluye a tres de las cinco especies más cultivadas en la actualidad por el hombre, como son *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens* (Eshbaugh *et al.* 1983); por otra parte *C. eximium* pudo ser el ancestro que diera lugar a *C. cardenasii* y *C. pubescens* (Walsh y Hoot, 2001).

La domesticación de las diferentes especies de pimiento tuvo lugar entre los años 5200 y 3400 a.C. (Andrews, 1984), pudiendo darse de manera independiente en varias áreas y empleando diferentes especies silvestres. La combinación de evidencias arqueológicas, análisis genéticos y la distribución actual de las plantas, ha permitido a los investigadores sugerir que *C. annuum* fue inicialmente domesticado en México o en el norte de América Central, *C. frutescens* en el Caribe, *C. baccatum* en Bolivia, *C. chinense* en el norte de la Amazonia y *C. pubescens* en el sur de los Andes (Pickersgill, 1969). El pimiento fue traído a Europa ya en el primero de los viajes de Colón desde América. Su fácil germinación y la belleza de sus frutos lo llevaron pronto a todos los rincones de la Península Ibérica y rápidamente se extendió al resto de Europa y del mundo.

1.3 Citogenética del género *Capsicum*

El género *Capsicum* es mayoritariamente diploide, y aunque existe un pequeño número de especies silvestres que cuentan con un número cromosómico básico de $x = 13$ ($2n = 2x = 26$; como *C. campylopodium* Sendt. y *C. rhomboideum*), la mayoría de las especies del género *Capsicum* presentan el número cromosómico de $x = 12$ ($2n = 2x = 24$) (Moscone *et al.* 1995, 2003). El genoma de *Capsicum* es grande, con contenidos de ADN nuclear que varían desde los 3,32 pg por núcleo en *C. annuum* L. hasta los 5,77 pg en *C. parvifolium* Sendtn. Estos valores corresponden a una longitud del genoma de 3381 y 5655 Mbp en *C. annuum* y *C. parvifolium* Sendtn., respectivamente (Moscone *et al.* 2003).

1.4 Producción y usos del pimiento

El pimiento es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, en lo que se refiere a producción y a superficie cultivada. Su importancia económica es muy elevada, siendo para muchas regiones, tanto del mundo como de España, una de las principales fuentes de riqueza (FAO 2006). En los últimos años, la producción mundial de pimiento ha llegado a superar los 24 millones de toneladas métricas en 3,66 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2005). El continente con mayor superficie cultivada de pimiento es Asia, destacando China, Indonesia y Turquía. A continuación se encuentra África (Nigeria, Ghana y Egipto). A nivel europeo, España es el primer productor de pimiento fresco y para seco (con 873.000 Tn), seguido de los Países Bajos (con 365.000 Tn) e Italia (con 293.647 Tn). (FAOSTAT, 2011) En América los países con una mayor superficie cultivada son México y Estados Unidos. (Tabla 1.1)

Tabla 1.1 Análisis mundial de superficie, rendimiento y producción de pimiento. (FAOSTAT, 2011) (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>)

País	Año 2010		
	Producción (Tn)	Área cosechada (Ha)	Rendimiento (Kg/Ha)
China	15.023.503	672.330	223.454
México	2.335.560	143.979	162.215
Turquía	1.986.700	99.000	200.677
Indonesia	1332.360	237.520	56.095
EE.UU	932.580	30.600	304.765
España	872.000	18.000	484.444
Egipto	655.841	38.390	170.836
Nigeria	500.000	60.000	83.333
Ghana	294.100	73.500	40.014
Italia	293.647	11.764	249.615

A nivel de España, las últimas estadísticas oficiales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente referidas al año 2011 (http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_Avance.pdf), indican que se cultivaron unas 18.000 Ha, de las que aproximadamente un 60% (10.586 Ha) lo estaban en invernadero. En cuanto a producción, el pimiento con 873.011 Tn, se encuentra en el tercer lugar tras el tomate y el melón (MAGRAMA 2011). La principal zona productora es Andalucía (547.216 Tn) y en especial la provincia de Almería, con 7.475 Ha, de las que se obtiene el 50% de la producción nacional (437.403 Tn) de pimiento. Le siguen en importancia Galicia (1.401 Ha), la Región de Murcia (1.379 Ha) y Castilla La Mancha (1.158 Ha). (Tabla 1.2).

En relación al cultivo de pimiento para la obtención de pimentón, en España se destinaron un total de 4.882 Ha. La Comunidad Autónoma de Extremadura figura en primer lugar, con una superficie de 2.558 Ha, seguida de la Región de Murcia, con 1.972 Ha (MAGRAMA, 2011). Estas cifras indican la gran importancia de este cultivo en nuestro país y su liderazgo como principal suministrador de pimiento en Europa.

El principal uso del pimiento es la alimentación. Su éxito radica en sus tres principales vías de consumo: pimiento en fresco, en conserva y como especia. No obstante, el deseo de diversificación del consumidor está dando cabida a nuevos productos. Hoy en día son muchas las industrias y particulares que se dedican en España al cultivo y envasado de pimientos, lo que ha fomentado el desarrollo de denominaciones de origen protegidas o indicaciones geográficas, como las del Pimiento

Asado del Bierzo (Castilla y León), Pimiento de Fresno-Benavente (Castilla y León), Pimiento de Piquillo de Lodosa (Comunidad Foral de Navarra), Pimentón de la Vera (Extremadura), Pimentón de Murcia (Murcia), Pimiento Riojano (La Rioja), Pimiento de Ezpeleta (Euskadi), Pimiento de Gernika (Euskadi), Pimiento da Arnoia (Galicia), Pimiento de Herbón (Galicia), Pimiento de O Couto (Galicia) y Pimiento de Oímbra (Galicia) (MAGRAMA, 2012).

Tabla 1.2 Análisis por comunidades autónomas de superficie, rendimiento y producción, 2010 (MAGRAMA,2011)

(http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_Avance.pdf)

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)			Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido		Aire libre	Protegido	
A Coruña	15	190	215	10.000	25.000	55.000	16.725
Lugo	3	51	63	13.000	30.000	65.000	5.664
Ourense	–	107	117	–	25.000	65.000	10.280
Pontevedra	–	173	196	–	25.000	50.000	14.125
Galicia	18	521	591	10.500	25.489	56.387	46.794
P. de Asturias	10	5	–	10.000	20.000	–	200
Cantabria	14	3	–	16.000	24.000	–	296
País vasco	115	134	50	8.070	16.454	29.442	4.605
Navarra	–	868	3	–	21.361	21.750	18.607
La Rioja	–	174	3	–	24.000	44.000	4.308
Aragón	–	19	–	–	24.158	–	459
Cataluña	2	383	–	11.000	23.243	–	8.924
Baleares	–	61	27	–	20.200	40.200	2.318
Castilla y León	1	304	10	18.000	22.819	64.700	7.602
Madrid	–	100	–	–	25.000	–	2.500
Castilla la Mancha	–	1.407	10	–	34.556	48.000	49.101
C. Valenciana	3	223	570	10.000	18.462	65.930	41.727
R. de Murcia	–	219	1.452	–	45.000	80.500	126.741
Extremadura	–	493	22	–	33.449	239.318	21.756
Andalucía	16	2.573	8.357	6.828	32.024	59.820	582.421
Canarias	6	56	108	10.000	43.946	78.117	10.958
España	185	7.543	11.203	9.082	29.477	62.955	929.317

1.5 Importancia de los recursos fitogenéticos

Según el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO (2001) los recursos fitogenéticos son “cualquier material genético de origen vegetal de valor real o potencial para la alimentación y la agricultura”.

Debido a la domesticación de las plantas, el advenimiento de la mejora genética vegetal, la aparición de nuevas plagas, malas hierbas y enfermedades, así como el deterioro ambiental derivado de la urbanización, desbrozo y deforestación de las tierras; se está produciendo una erosión sin precedentes de la base genética de las variedades agrícolas existentes, dentro de las cuales el pimiento no es una excepción. Esta diversidad genética dentro de las especies es la materia prima de la que se abastecen los mejoradores para poder crear nuevas variedades de plantas con mejores rasgos agronómicos como robustez y rendimiento, variedades que se adapten a la aparición de nuevas plagas y enfermedades y/o a las cambiantes condiciones ambientales, que puedan ser cultivadas en nuevos hábitats, etc.

Por todo ello, cada vez es más necesaria la conservación de dicha diversidad genética mediante estrategias de conservación *in situ* (por los agricultores locales) y *ex situ* (mediante su cultivo en zonas de aclimatación o mediante la conservación de semillas en bancos de germoplasma), así como la búsqueda de nuevas fuentes de variabilidad dentro del acervo genético de una especie.

Para explorar la variabilidad genética existente en una colección de variedades autóctonas, es esencial realizar una caracterización y evaluación de dicha diversidad. Los métodos de análisis de la diversidad genética han evolucionado de manera gradual, partiendo de los análisis basados en caracteres morfológicos, pasando por las evaluaciones electroforéticas de variantes bioquímicas y, más recientemente, mediante el análisis molecular de las variantes existentes en las secuencias de ADN.

1.6 Marcadores moleculares

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

Los marcadores para ser considerados como tales tienen que reunir una serie de características, aunque no todos los tipos de marcadores cumplen la totalidad, así serán considerados mejores marcadores cuanto más se ajusten a éstas. Estas características son: alto grado de polimorfismo, herencia mendeliana codominante, simplicidad en la identificación y análisis, posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo de la planta, aparición frecuente a lo largo del genoma, que no se vea influenciado por el ambiente, fácil acceso (disponibilidad) y alta reproducibilidad.

Dentro de los marcadores moleculares podemos distinguir dos tipos: los marcadores bioquímicos y los marcadores basados en el ADN. Las principales ventajas de estos últimos es que son fenotípicamente neutros, pueden ser evaluados desde los primeros estados del desarrollo de la planta, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, permiten la identificación correcta de variedades sin necesidad de muchos caracteres y están libres de efectos epistáticos (Tanksley, 1983; Powell, 1992; Phillips *et al.* 1995; Rallo *et al.* 2002). Entre los marcadores de ADN podemos diferenciar dos grandes grupos según el método usado en su detección: aquellos basados en la hibridación y aquellos basados en la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Dentro de estos últimos se han descrito distintos tipos en función de las técnicas empleadas para su análisis. En la Tabla 1.3 se recogen las características principales de los marcadores basados en el ADN más importantes.

A continuación se citarán brevemente algunos tipos de marcadores, explicando con mayor detenimiento los Microsatélites o SSR (Single Sequence Repeat), que son los que emplearemos en este estudio.

- a. RFLP (Random Fragment Length Polymorphisms): Detectan polimorfismos producidos al digerir el ADN con enzimas de restricción. El polimorfismo a nivel de dianas de restricción será observado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos detectados.
- b. RAPD (Randomly-Amplified Polymorphic DNA): Es la primera técnica que está dentro de las que emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método utiliza secuencias pequeñas de oligos (10-12 bp) que amplifican regiones específicas distribuidas al azar por todo el genoma (Williams *et al.* 1990).
- c. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): Esta técnica también está basada en la PCR y en este caso se combinan los principios de los RFLP y de la PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por el corte con enzimas de restricción son amplificados selectivamente.
- d. Minisatelites (VNTR – Variable Number Tandem Repeat): Son sondas de secuencias simples repetidas. Las secuencias repetidas de estos minisatélites son monómeros que generalmente tienen 15-100 bp y están repetidos hasta 50 veces.
- e. SNP (Single Nucleotide Polymorphism): Es uno de los últimos tipos de marcadores moleculares basados en el ADN que se han desarrollado. Su fundamento consiste, como su nombre indica, en un único cambio de la secuencia nucleotídica. Los SNPs se encuentran con gran frecuencia a lo largo del genoma, siendo ésta del orden de un SNP cada 100-300 bp en animales y de uno cada 20-100 bp en plantas (Wolters *et al.* 2000).

1.7 Microsatélites

Consisten en una secuencia específica de nucleótidos que contienen mono-, di-, tri- o tetra- repeticiones en tándem (Tautz *et al.* 1986), cuyas secuencias adyacentes, altamente conservadas en la evolución (Brohede y Ellegren, 1999), permiten amplificarlas mediante PCR (Saiki *et al.* 1988). Se encuentran tanto en regiones

codificantes como no codificantes, siendo más frecuentes en estas últimas (Hancock, 1996; Metzgar *et al.* 2000; Morgante *et al.* 2002).

En los últimos años, los marcadores microsatélites se han convertido en los marcadores predilectos para análisis de genotipado y diversidad genética debido a su elevado grado de polimorfismo, reproducibilidad, estabilidad, facilidad de manejo, herencia codominante y multialelismo (Goldstein y Pollock, 1997; Cornide *et al.* 2002).

Podemos distinguir diferentes tipos de marcadores que contienen secuencias microsatélites, entre ellas podemos desatacar:

- SSRs (Simple Sequence Repeat): generados por amplificación en una reacción de PCR usando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes.
- ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeat): basados en la amplificación de las regiones entre microsatélites cercanos.
- SAMPLs (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci): utilizan la metodología AFLP con una excepción, y ésta es que, en la segunda amplificación uno de los cebadores es complementario a la secuencia microsatélite.

Tabla 1.3. Resumen de las características principales de los distintos tipos de marcadores moleculares.

Características	Marcadores					
	RFLP	RAPD	AFLP	VNTR	SSR	SNP
Polimorfismo	Medio	Medio-Alto	Medio-Alto	Medio-Alto	Alto	Medio-Alto
Calidad del ADN	Alta	Alta	Moderada	Alta	Moderada	Alta
Nº loci	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Expresión alélica	Codominante	Dominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Estabilidad ambiental	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Reproducibilidad	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta
Conocimiento previo	No	No	No	Sí	Sí	Sí
Dificultad teórica	Intermedia/Alta	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Baja	Media
Coste en el análisis	Alto	Alto	Intermedio	Intermedio	Bajo	Medio-Alto

La detección e identificación de microsatélites en estudios de genotipado puede realizarse con distintas técnicas. La más comúnmente utilizada es la detección mediante electroforesis en geles de acrilamida en lámina vertical, en la cual las muestras migran a través de la matriz debido a un campo eléctrico, haciendo que las moléculas más grandes migren más despacio. Este método permite analizar muestras de hasta unas 1400 bp. Otra técnica se basa en el empleo de analizadores genéticos automatizados, donde la muestra es sometida a una electroforesis capilar, en la cual la muestra migra a través de un capilar relleno de polímero. Esta técnica tiene la clara ventaja de la automatización del proceso y la desventaja del elevado coste del equipo y de que sólo analiza muestras de hasta 500 bp. Otro problema añadido es el coste adicional de marcaje de uno de los oligos con un fluoróforo. Para superar este último inconveniente, Oetting *et al.* 1998 y recientemente Schuelke (2000) han propuesto una alternativa basada en el empleo de oligos universales (normalmente M13) marcados con fluorescencia. En esta metodología, la amplificación del microsatélite se realiza con tres oligos; un oligo "forward" que lleva unida una cola M13 en el extremo 5', un oligo "reverse" y un oligo M13 con una secuencia complementaria a la cola unida al oligo "forward" y marcado con un fluoróforo. Esta técnica de detección de fragmentos de PCR ha sido ampliamente utilizada en otras especies de plantas (Santra *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009; Baldwin *et al.* 2012). Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos, esta metodología no ha sido evaluada en la detección de SSR en pimiento.

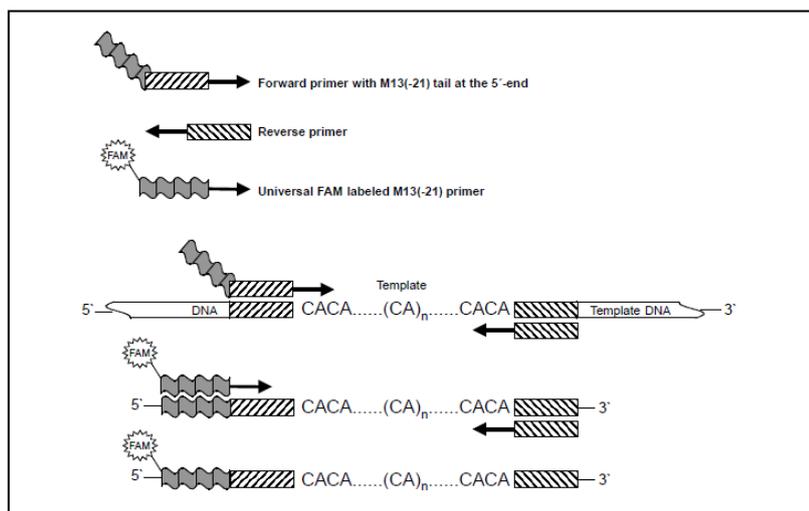


Figura 1.1 Esquema de la metodología M13 para el marcaje de microsatélites (Tomado de Schuelke, 2000)

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se han perseguido los siguientes objetivos:

1. Puesta a punto de la metodología M13 para la detección de marcadores de tipo microsatélite en pimiento.
2. Caracterización de la variabilidad agromorfológica y de la diversidad genética en variedades de pimiento autóctonas de Galicia.
3. Comparación de las variedades gallegas con otros ecotipos de pimiento del norte de España y emplazamiento de la diversidad genética en el marco de variedades comerciales y otras especies del género *Capsicum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Se emplearon 10 ecotipos de pimiento gallegos (*Capsicum annuum* var. *annuum*) (Figura 3.1), de los cuales cinco han sido descritos en Rodríguez-Bao *et al.* (2004) (Padrón, Couto, Arnoia, Branco Rosal y Oímbra) y otros cinco (Mougán, Punxín, Piñeira, Vilanova y Couto grande) que han sido descritos en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Se emplearon además 6 ecotipos vascos, 8 variedades comerciales y 10 *Capsicum* de distintas especies (Tabla 3.1).

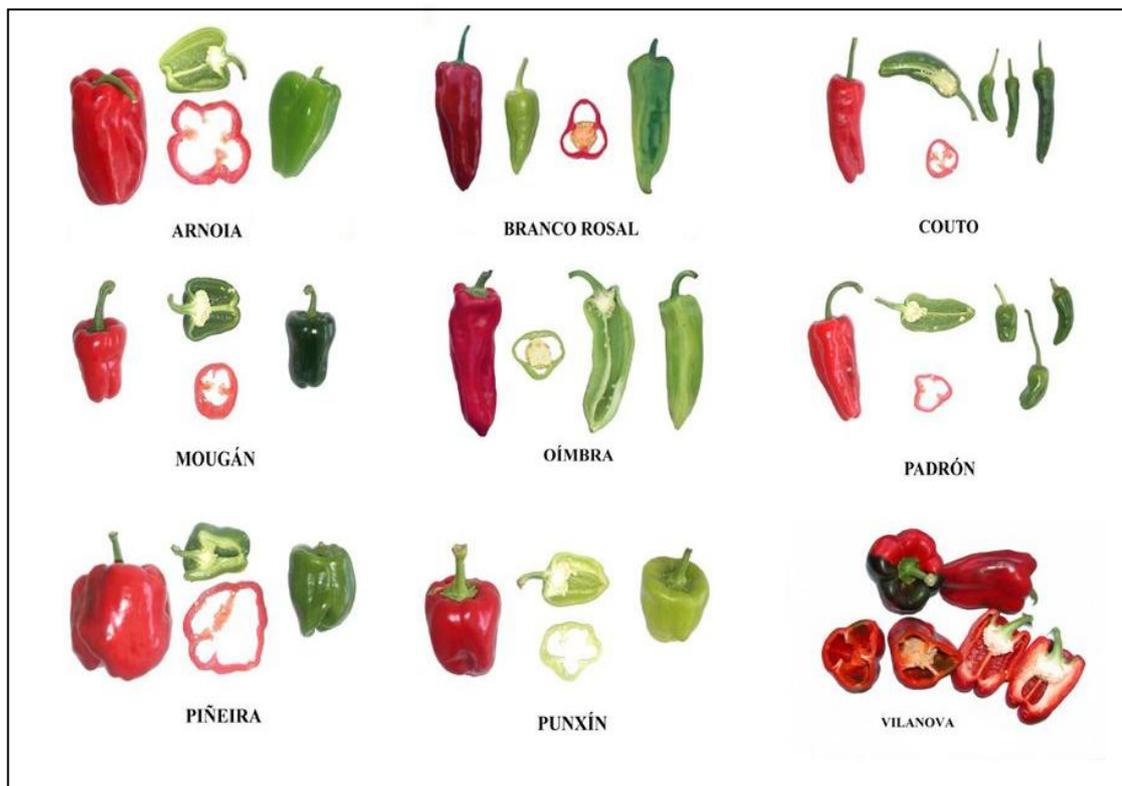


Figura 3.1 Ecotipos de pimientos autóctonos gallegos (*Capsicum annuum* var. *annuum*) empleados en el estudio, excepto Couto Grande.

Tabla 3.1 Tipo, denominación, origen y fuente de los ecotipos de pimiento empleados en este estudio

Tipo de pimiento	Línea	Origen	Fuente
Ecotipos gallegos			
Arnoia	AR_330_05	Ourense	CIAM ¹
Branco Rosal	BR_97_05	Pontevedra	CIAM ¹
Couto	CO_12B	Coruña	CIAM ¹
Couto Grande	CG_10_117	Coruña	CIAM ¹
Mougán	MG_318_05	Lugo	CIAM ¹
Oimbra	OI_27_05	Ourense	CIAM ¹
Padrón	ETH_209_05	Coruña	CIAM ¹
Piñeira	PI_17_04	Lugo	CIAM ¹
Punxín	PX_118_05	Ourense	CIAM ¹
Vilanova	VI_1_4	Pontevedra	CIAM ¹
Ecotipos vascos			
Orozco	Orozco	Guipúzcoa	CIAM ¹
Ibarra	Berezi	Guipúzcoa	CIAM ¹
Loyola	Leuna	Vizcaya	CIAM ¹
Gernika	IKER	Vizcaya	CIAM ¹
Corigero	Cor 01	Navarra	CIAM ¹
Piquillo	-	Navarra	CIAM ¹
Ecotipos comerciales			
Italiano	-	-	Comercial
Cayena	-	-	Comercial
Peperone	-	-	Comercial
P. Comercial	-	-	Comercial
PI201234	-	USA	USDA
SCM334	-	México	USDA
Yolo Wonder	-	-	Comercial
Lamuyo	-	-	Comercial
Otras especies			
<i>C. baccatum</i>	C-70	Francia	CITA ²
<i>C. chinense</i>	C-143	USA	CITA ²
<i>C. chacoense</i>	C-154	Países Bajos	CITA ²
<i>C. frutescens</i>	C-162	Países Bajos	CITA ²
<i>C. eximium</i>	C-177	Alemania	CITA ²
<i>C. galapagoense</i>	C-179	Alemania	CITA ²
<i>C. praetermissum</i>	C-180	Alemania	CITA ²
<i>C. pubescens</i>	C-228	Perú	CITA ²
<i>C. tovarii</i>	C-261	USA	CITA ²
<i>C. cardenasii</i>	C-306	Países Bajos	CITA ²

¹CIAM: Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo

²CITA: Centro de Investigación y Tecnología Agraria de Aragón

3.2 Análisis de caracteres agromorfológicos

Se emplearon los 10 ecotipos gallegos, excepto Vilanova, y 5 de las 6 variedades vascas (excepto Piquillo) para analizar diversos caracteres agromorfológicos, tanto cuantitativos y cualitativos. La caracterización se realizó en el año 2005 en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) siguiendo un diseño de bloques completos al azar (BCA) con 3 repeticiones de 10 plantas por línea.

Los caracteres cuantitativos analizados en este estudio fueron los siguientes: ancho, longitud, diámetro y altura de la planta; longitud, ancho y peso del fruto; longitud del pedicelo, espesor de la pared del fruto; número de lóculos y longitud de la placenta.

Como caracteres cualitativos fueron analizados el color del fruto maduro, la forma del fruto, el cuello base del fruto, la forma del ápice del fruto, el apéndice y el arrugamiento.

Todos estos caracteres, cuantitativos y cualitativos, así como las escalas o baremos a través de los cuales están medidos cada uno de ellos, siguen las normas establecidas por el International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) y registradas en su publicación referente a los “Descriptor de *Capsicum*” (Anexo I)

3.3 Extracción del ADN

Para llevar a cabo la extracción de ADN se utilizarán hojas jóvenes de plántulas de pimiento de aproximadamente unos 15 días de edad, siguiendo el método de extracción descrito en Garcés-Claver *et al.* (2007). La concentración de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro ajustándose a 25 ng/ μ l. Las muestras se conservaron en congelador a -20°C hasta su uso posterior.

3.4 Selección de los marcadores moleculares

Los marcadores SSR, CAPs y PCR, así como las secuencias de los oligos empleados para llevar a cabo su amplificación, fueron seleccionados a partir de la información disponible en la bibliografía y en <http://solgenomics.net> (Tabla 3.2). En el

caso de los microsatélites, se seleccionaron aquellos marcadores de los cuales se tenía la constancia de que poseían un elevado potencial para discernir entre distintas variedades de *C. annuum* con un PIC (Polymorphic Information Content) elevado, lo cual indica la presencia de distintos alelos en el locus, así como de una elevada frecuencia alélica de los mismos. Se incluyeron además tres marcadores (Pun1, C2At2g24270 y p-AMT) asociados a la presencia o ausencia de pungencia en pimiento (Garcés-Claver, 2007; Stellari *et al.* 2010; Tanaka *et al.* 2010) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Descripción de los 18 marcadores analizados, incluyendo localización cromosómica (Cr), motivo que se repite (solo para SSR), tamaño en bp y fuente de referencia.

Nombre del marcador	Cr	Tipo	Repetición	Tamaño (bp)	Fuente
Hpms1-139	1	SSR	(CT) ₂ (AG) ₁₅	299	Lee et al. (2004)
CA514272	2	SSR	-	259	Stellari et al. (2010)
Pun1	2	PCR	-	1130/1659	Garces-Claver et al. (2007)
Hpms1-173	3	SSR	(GA) ₁₆ (TG) ₂	163	Lee et al. (2004)
CAMS-647	3	SSR	(TAT) ₆ TG(TTA) ₃ (TAT) ₂₁	221	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
Hpms1-5	6	SSR	(AT) ₁₁ (GT) ₁₇	311	Lee <i>et al.</i> (2004)
C2At2g24270	7	PCR	-	1000/1200	Stellari <i>et al.</i> (2010)
CAMS-864	7	SSR	(AGA) ₃₂	222	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
Hpms2-24	9	SSR	(CT) ₁₇ (CA)5A ₂₁	205	Lee <i>et al.</i> (2004)
CAMS-405	11	SSR	(TC) ₁₈	241	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
CP10023	12	SSR	-	188	DNALandmarks
Hpms1-168	16	SSR	(TA) ₁₇ (GA) ₁₂	208	Lee <i>et al.</i> (2004)
AGi021	-	SSR	(TTTA) ₄	285	Ince <i>et al.</i> (2010)
GPMS-197	-	SSR	(GA) ₃ (TAT) ₁₆	272	Nagy <i>et al.</i> (2007)
p-AMT	-	CAPs (<i>RsaI</i>)	-	-	Tanaka <i>et al.</i> (2010)
GPMS-117	-	SSR	(ATT) ₁₉	177	Nagy <i>et al.</i> (2007)
Hpms1-111	-	SSR	(AAT) ₁₁	159	Lee <i>et al.</i> (2004)
GP20068	10	SSR	-	118/120	DNALandmarks

3.5 Amplificación mediante PCR y detección en analizador genético.

Las mezclas de PCR se realizaron en un volumen final de 15 μ l que incluía 1x PCR Buffer, 0,2 μ M de cebador “reverse”, 0,18 μ M del cebador universal M13, 0,04 μ M del cebador “forward” que lleva unida una cola M13 en el extremo 5', 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq Polymerase y 50 ng de ADN genómico.

La amplificación se realizó o bien con un programa de TouchDown (paso inicial a 94°C-5min seguido de 12 ciclos (-0,5 °C/ciclo) de 94°C-30 seg, 62°C-30 seg, 72°C-30 seg, y a continuación 35 ciclos de 94°C-30 seg, 56°C-30 seg, 72°C-30 seg, para finalizar con un paso a 72°C-10 min, o bien con el siguiente programa de PCR; 94°C-5 min, (94°C-30 seg, 56°C-45 seg, 72°C-60 seg) 35X, 72°C-10 min.

La visualización de las bandas correspondientes al producto de PCR se realizó en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con SYBR Safe bajo luz UV. El posterior análisis de los fragmentos se llevó a cabo en un equipo Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzer de 16 capilares disponible en los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña (SAI). El análisis de los resultados se realizó con el software GeneMapper.

3.6 Análisis de resultados

Los datos agronómicos cuantitativos fueron analizados mediante un análisis de componentes principales (ACP) con el software SPSS versión 17. Previamente al ACP se realizaron análisis de la varianza para confirmar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes ecotipos para las variables muestreadas. El ACP se realizó sobre una matriz de correlación derivada de los caracteres significativos. Se empleó un método de rotación Varimax con normalización Kaiser (Kaiser, 1960).

Los parámetros genéticos calculados para los marcadores SSR fueron los siguientes: número de alelos observados por locus, frecuencias alélicas de cada locus, índice de diversidad de Nei (Nei, 1987) y el "Polymorphism Information Content" (PIC) (Botstein *et al.* 1980). Todos los valores fueron calculados tanto para el conjunto de individuos como para las poblaciones establecidas *a priori* (gallegas, vascas,

comerciales y "no *annuum*") mediante la herramienta MSTools disponible en <http://animalgenomics.ucd.ie/sdeparc/ms-toolkit>.

Las distancias genéticas entre ecotipos se estimaron a partir de una matriz de 0/1 (ausencia/presencia de un determinado alelo en un locus concreto). Las similitudes genéticas se calcularon usando el coeficiente de Dice (Nei y Li, 1979) y se construyó un dendograma según el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average). La matriz de similaridad se empleó también para la representación de los ecotipos en el espacio mediante un análisis de coordenadas principales. Todos los análisis se realizaron con el software NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización agromorfológica

4.1.1 Caracteres cualitativos

Para el análisis de los caracteres cualitativos se han hallado las frecuencias relativas de dichos caracteres en el grupo de ecotipos gallegos y vascos. En vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que existen claras diferencias entre los ecotipos gallegos y los vascos en caracteres como el color del fruto y la forma, tanto del fruto como del ápice (Figuras 4.1 - 4.4).

Los frutos de los ecotipos gallegos presentan una coloración equitativamente representada por el rojo (40%) o el rojo oscuro (53%), existiendo alguna línea cuyo fruto es rojo claro (5%). Por el contrario, en los ecotipos vascos podemos observar una clara predominancia de los frutos de color rojo oscuro (80,6%), frente a la baja presencia de los rojos (19%) y la inexistencia de los rojos claros (Figura 4.1).

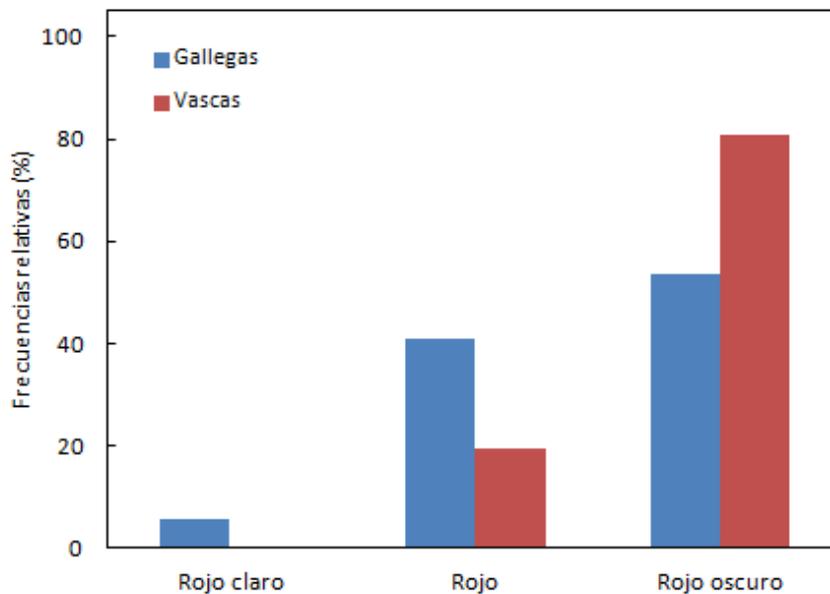


Figura 4.1 Frecuencias relativas (%) del carácter color del fruto maduro en los ecotipos gallegos y vascos.

En cuanto a la forma del fruto podemos observar que los ecotipos gallegos presentan una mayor variedad de formas, dentro de las cuales predominan las formas acampanuladas y en bloque (67%) y las triangulares (22%) en sus frutos, mientras que en los ecotipos vascos predomina la forma acampanulada (43%) seguida de la acampanulada y en bloque (29%) y la elongada (26%) (Figura 4.2).

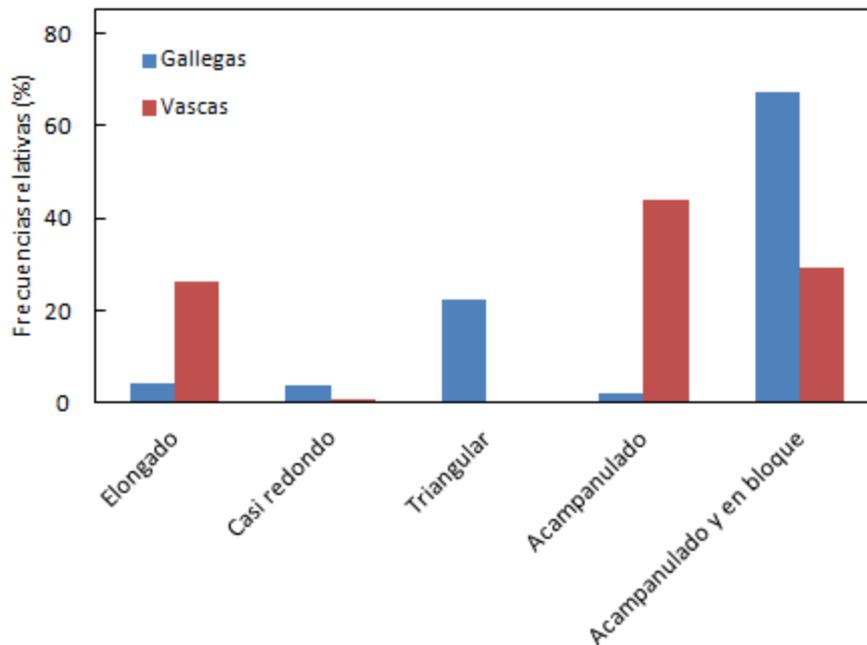


Figura 4.2 Frecuencias relativas (%) del carácter forma del fruto maduro en los ecotipos gallegos y vascos.

Respecto a la forma del ápice podemos apreciar un claro predominio de las formas hundidas y romas, con porcentajes del 47% y 31% respectivamente, en los ecotipos gallegos; mientras que en los ecotipos vascos observamos una clara predominancia de la forma puntuda (52%), seguida de las formas romas y hundidas, con un 24% y un 22% respectivamente (Figura 4.3).

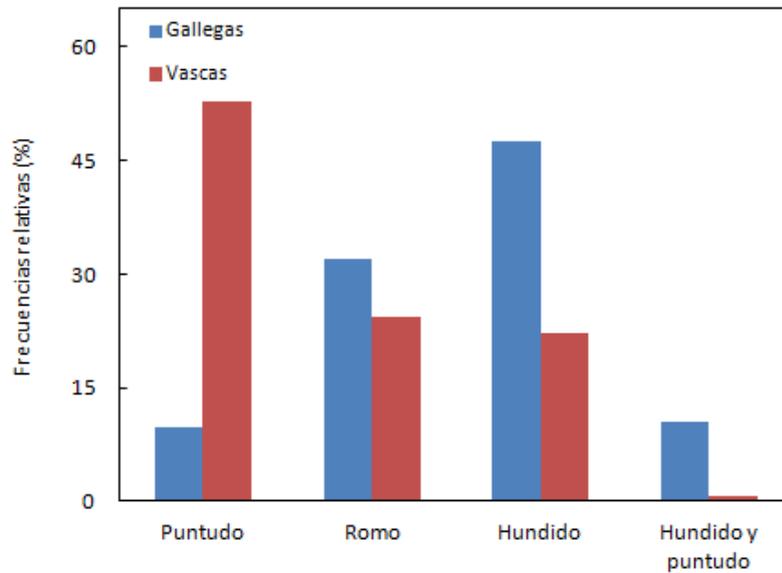


Figura 4.3 Frecuencias relativas (%) del carácter forma del ápice en los ecotipos gallegos y vascos.

El arrugamiento del fruto intermedio es el predominante en ambos grupos (50%), seguido muy de cerca, en el caso de los ecotipos gallegos por el arrugamiento muy corrugado (47%), siendo este ligeramente inferior en los vascos (39%); situación que se revierte en el arrugamiento levemente corrugado, el cual es superior en los ecotipos vascos (11%), frente al 3% de los gallegos (Figura 4.4).

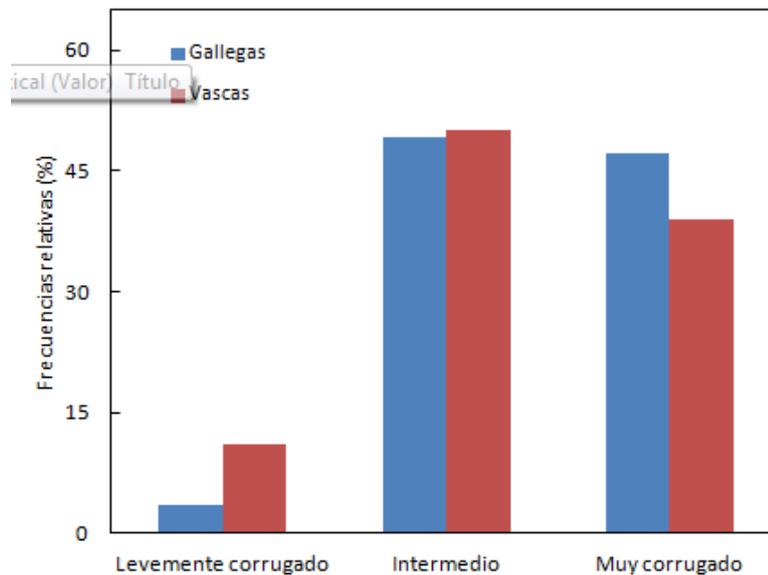


Figura 4.4 Frecuencias relativas (%) del carácter arrugamiento del fruto en los ecotipos gallegos y vascos.

El apéndice y el cuello en la base del fruto están mayoritariamente ausentes tanto en los ecotipos gallegos como vascos (98% y 95%, respectivamente para el apéndice, y del 100% en ambos ecotipos para el cuello en la base del fruto).

4.1.2 Caracteres cuantitativos

En vista de los resultados obtenidos podemos observar que el carácter peso del fruto es el que presenta mayores diferencias entre ecotipos gallegos y vascos (90,30 g y 59,23 g, respectivamente). En este carácter cabe destacar la heterogeneidad existente, en cuanto al peso de los frutos, entre los distintos ecotipos de ambos grupos, ya que presentan valores que van desde los 8,11 g del pimiento de Ibarra (vasco) a los 162,69 g del ecotipo Piñeira (gallego) (Tabla 4.1).

Existen también claras diferencias entre los ecotipos gallegos y vascos en cuanto a la longitud de la placenta (21,08 cm y 31,85 cm, respectivamente). Sorprende el dato correspondiente al pimiento de Ibarra, de 56,81 cm, muy por encima de la media de los otros ecotipos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Media \pm desviación típica de los caracteres cuantitativos estudiados en ecotipos gallegos y vascos.

Ecotipos	Caracteres cuantitativos										
	Ancho planta	Longitud planta	Diámetro planta	Altura planta	Longitud fruto	Ancho fruto	Peso fruto	Longitud pedicelo	Pared fruto	Nº lóculos	Longitud placenta
Couto	51,93 \pm 6,46	22,00 \pm 2,44	1,61 \pm 0,33	105,87 \pm 16,89	9,47 \pm 1,33	3,01 \pm 0,39	21,02 \pm 5,97	3,19 \pm 0,54	2,11 \pm 0,60	2,80 \pm 0,48	22,55 \pm 5,43
Padrón	73,37 \pm 9,17	34,10 \pm 2,81	1,56 \pm 0,24	144,00 \pm 15,80	7,49 \pm 0,96	3,73 \pm 0,40	26,64 \pm 7,65	5,19 \pm 0,72	2,95 \pm 1,09	3,03 \pm 0,41	20,04 \pm 3,52
Arnoia	62,73 \pm 8,44	20,73 \pm 2,41	1,77 \pm 0,15	105,57 \pm 10,07	9,61 \pm 1,45	6,00 \pm 0,55	86,46 \pm 19,61	4,53 \pm 0,63	4,43 \pm 0,73	3,57 \pm 0,73	20,32 \pm 5,13
Punxín	68,47 \pm 9,65	20,26 \pm 3,07	2,07 \pm 0,29	114,53 \pm 10,63	8,97 \pm 1,55	6,06 \pm 0,83	84,24 \pm 26,22	3,73 \pm 1,20	4,60 \pm 1,21	3,38 \pm 0,74	18,03 \pm 4,76
Oímbra	62,35 \pm 6,95	28,70 \pm 2,77	2,03 \pm 0,27	131,87 \pm 11,40	13,29 \pm 2,19	6,32 \pm 0,86	160,08 \pm 56,61	5,67 \pm 0,93	6,37 \pm 1,22	4,18 \pm 0,48	19,84 \pm 3,21
Mougán	54,52 \pm 8,95	12,28 \pm 2,42	1,51 \pm 0,28	104,66 \pm 13,22	6,58 \pm 1,01	4,62 \pm 0,45	34,57 \pm 9,76	3,89 \pm 0,63	3,04 \pm 0,72	2,80 \pm 0,61	17,89 \pm 3,65
Branco Rosal	59,03 \pm 8,53	20,97 \pm 1,94	1,90 \pm 0,24	96,17 \pm 14,89	12,43 \pm 1,51	5,50 \pm 0,72	88,84 \pm 18,58	4,45 \pm 0,73	4,06 \pm 0,97	2,80 \pm 0,76	18,10 \pm 4,70
Piñeira	64,90 \pm 14,82	18,60 \pm 2,49	1,86 \pm 0,28	108,30 \pm 10,19	7,97 \pm 1,46	7,57 \pm 1,34	162,69 \pm 64,26	3,23 \pm 0,60	5,46 \pm 1,21	3,59 \pm 0,57	26,76 \pm 7,95
Couto Grande	68,78 \pm 13,84	24,78 \pm 4,37	2,00 \pm 0,33	109,85 \pm 8,15	6,76 \pm 1,18	7,93 \pm 1,46	160,47 \pm 80,89	4,25 \pm 1,09	5,90 \pm 0,99	4,33 \pm 0,62	25,88 \pm 6,80
TOTAL	63,57 \pm 12,27	22,46 \pm 6,58	1,79 \pm 0,33	113,00 \pm 19,19	9,18 \pm 2,66	5,58 \pm 1,77	90,30 \pm 68,56	4,25 \pm 1,11	4,28 \pm 1,68	3,37 \pm 0,82	21,08 \pm 6,01
Ibarra	69,56 \pm 12,04	21,19 \pm 4,38	1,43 \pm 0,28	118,41 \pm 9,31	14,80 \pm 1,27	1,45 \pm 0,19	8,11 \pm 2,35	4,11 \pm 0,50	0,92 \pm 0,48	2,23 \pm 0,43	56,81 \pm 12,39
Corigero	67,52 \pm 10,69	26,38 \pm 3,13	1,87 \pm 0,22	111,41 \pm 13,64	12,73 \pm 2,16	5,01 \pm 0,58	96,48 \pm 28,02	4,45 \pm 0,75	5,58 \pm 1,44	2,93 \pm 0,69	31,65 \pm 7,50
Loyola	68,53 \pm 12,16	26,37 \pm 7,22	1,93 \pm 0,27	102,63 \pm 14,73	12,52 \pm 1,82	6,42 \pm 0,73	146,91 \pm 50,89	4,30 \pm 0,69	5,82 \pm 1,78	3,38 \pm 0,71	27,38 \pm 7,34
Gernika	68,44 \pm 10,54	26,44 \pm 3,85	1,44 \pm 0,19	125,78 \pm 15,56	10,82 \pm 1,35	3,57 \pm 0,40	21,20 \pm 8,57	4,54 \pm 0,67	1,34 \pm 0,68	3,20 \pm 0,48	21,15 \pm 4,05
Orozco	68,67 \pm 12,87	33,13 \pm 3,22	1,67 \pm 0,24	138,10 \pm 14,27	11,75 \pm 1,23	4,34 \pm 0,47	39,30 \pm 15,12	4,55 \pm 0,69	2,50 \pm 1,69	3,17 \pm 0,46	22,20 \pm 3,21
TOTAL	68,53 \pm 11,57	26,83 \pm 5,96	1,68 \pm 0,32	119,20 \pm 18,36	12,53 \pm 2,08	4,10 \pm 1,67	59,23 \pm 56,21	4,40 \pm 0,67	3,14 \pm 2,43	2,97 \pm 0,68	31,85 \pm 15,24

4.1.3 Análisis de Componentes Principales (PCA)

Los resultados del análisis de varianza realizado en los 11 caracteres cuantitativos evaluados en ecotipos gallegos y vascos se recogen en el Anexo II. Se detectaron diferencias significativas para todos los caracteres, por lo que todos ellos fueron incluidos en el análisis de componentes principales realizado *a posteriori*.

El análisis multivariante reveló que los tres primeros componentes mostraron autovalores superiores a 1 y una varianza acumulada del 82,5% (Figura 4.5).

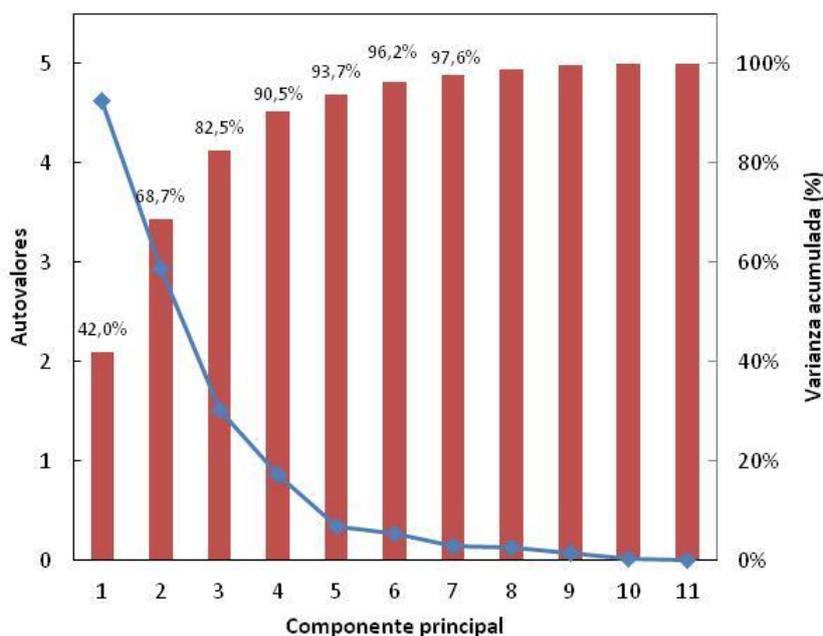


Figura 4.5. Autovalores y varianza acumulada para los componentes principales detectados con el PCA.

Observando la matriz de componentes rotados, en la cual se nos muestra la importancia que los distintos caracteres tienen en cada componente; podemos afirmar que el componente 1 estaría relacionado con las dimensiones del fruto, ya que los caracteres ancho del fruto, peso del fruto, pared del fruto y número de lóculos son los que más importancia tienen a la hora de explicar dicho componente. Por otra parte, el componente 2 explicaría como son las dimensiones de la planta, en tanto que el ancho, la longitud y la altura de la planta son las variables que mayor peso tienen a la hora de explicar este componente (Tabla 4.2)

Tabla 4.2. Matriz de componentes rotados (normalización Varimax con Kaiser) para cada carácter con respecto a los tres primeros componentes principales.

	Componente		
	1	2	3
peso_fruto	,977	-,028	,029
pared_fruto	,966	,004	-,050
diametro_planta	,929	-,012	-,005
ancho_fruto	,929	-,092	-,295
nº_loculos	,795	,273	-,369
longitud_planta	,007	,918	,049
altura_planta	-,292	,884	-,129
longitud_pedicelo	,135	,806	,035
ancho_planta	,116	,701	,289
longitud_placenta	-,241	-,047	,851
longitud_fruto	-,040	,222	,837

La proyección de los ecotipos gallegos y vascos en el gráfico de los dos primeros componentes principales se muestra en la Figura 4.6. Los diferentes ecotipos se agrupan en función de las "dimensiones del fruto" y de las "dimensiones de la planta". De esta forma, los ecotipos que están en la mitad derecha del gráfico (cuadrantes II y IV) tendrían mayor tamaño de fruto que los que estén ubicados en la mitad izquierda. Del mismo modo, pero influenciados por el componente 2, los ecotipos que se encuentran en la mitad superior del gráfico (cuadrantes I y II) presentan unas dimensiones de planta mayores que los que están en la mitad inferior.

Teniendo en cuenta esto, y relacionándolo con las medias obtenidas en el análisis anterior (Tabla 4.1), podemos apreciar 4 grupos: Un primer grupo formado por Padrón, Orozco y Gernika, con frutos pequeños y plantas de gran porte; un segundo grupo (Ibarra, Couto y Mougán), constituido por plantas de menor tamaño y frutos pequeños; un tercer grupo compuesto únicamente por Oímbra con la planta y los frutos grandes; y un cuarto grupo que englobaría a los ecotipos que presentan unas dimensiones, tanto de fruto como de planta que están cercanas a la media, este grupo lo formarían Corigero, Couto Grande, Arnoia, Punxín, Loyola, Blanco rosal y Piñeira (Figura 4.6).

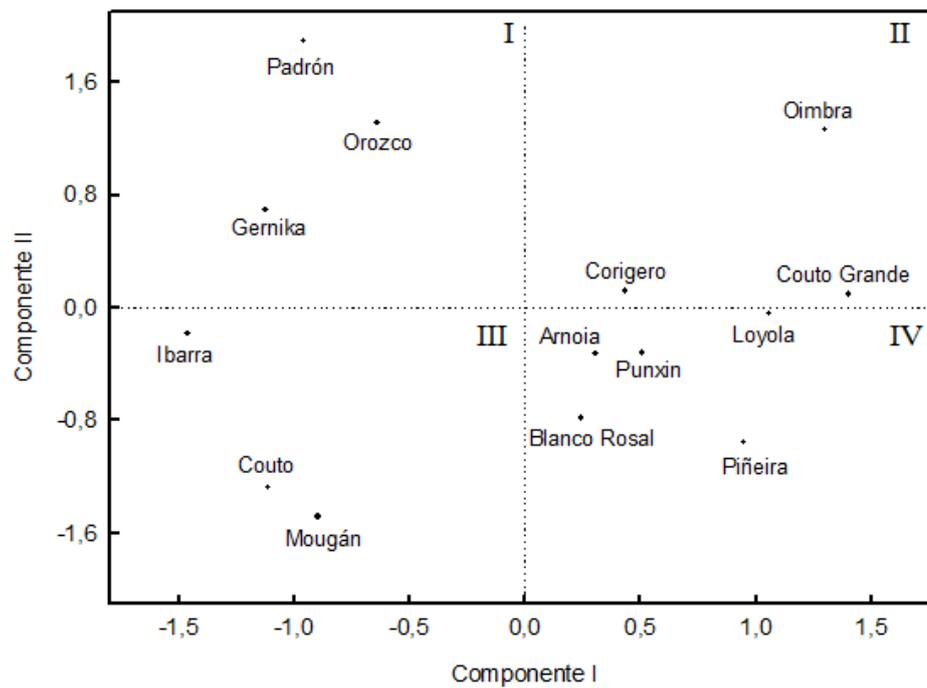


Figura 4.6. Representación de los ecotipos gallegos y vascos frente a los dos primeros componentes principales.

4.2 Análisis de los datos moleculares

4.2.1 Optimización de la metodología de marcaje M13

Los resultados obtenidos, en pimiento, mediante el uso de esta metodología han sido totalmente satisfactorios para todos los marcadores empleados, usando programas de TouchDown. Esta técnica nos permitió emplear oligos universales marcados con distintos fluoróforos (FAM, HEX y NED) en una misma reacción de amplificación, aumentando de esta manera la eficiencia de la detección y reduciendo sustancialmente los costes (Figura 4.7)

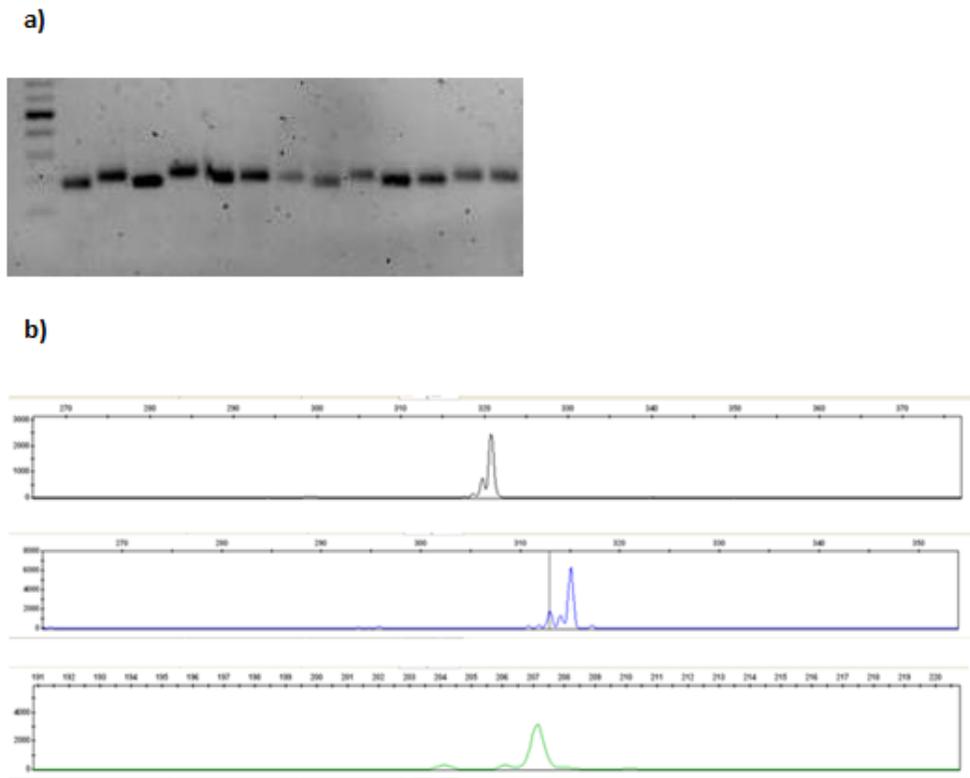


Figura 4.7 a) Representación en gel de agarosa al 1,5% de diferentes ecotipos de pimiento amplificados con el marcador Hpms24. b) Electroferogramas observados tras el análisis en el analizador genético. Negro es NED, azul es FAM y verde es HEX.

4.2.2. Polimorfismo e índices de diversidad

De los 18 marcadores empleados, uno (CAMS-864) no fue incluido en el posterior análisis debido a que no amplifica. De los 17 restantes, Hpms1-111 amplifica, pero da como resultado una doble banda de la cual no podemos discernir nuestra banda de estudio, por lo que también es descartado. Dentro de estos 16 marcadores, el Hpms1-168 es monomórfico, por lo que del mismo modo que CAMS-864 y Hpms1-111, fue descartado.

El marcador Pun1 basa su polimorfismo en la presencia de uno (1659 bp) o dos amplicones (1330/1659 bp). La presencia de una doble banda está teóricamente asociada al carácter pungente del pimiento (Garcés-Claver, 2007). Nuestros resultados muestran que dentro de las variedades gallegas, solo el ecotipo Mougán resulta picante, lo cual concuerda con datos previos obtenidos en el laboratorio, en los cuales se

detectaron en este ecotipo niveles relativamente altos de capsicina y dihidrocapsicina (datos no publicados), dos de los principales compuestos responsables del carácter picante del género *Capsicum* (Govindarajan *et al.* 1987).

El marcador C2Atg24270, presentó tres alelos de 900, 1000 y 1200 bp. Este marcador está asociado al alelo de 1000 bp del gen Pun2, responsable de la ausencia de pungencia en algunas especies del género *Capsicum* (Stellari *et al.* 2010). Los ecotipos gallegos y vascos presentan un alelo común (1200 bp) en contraposición con el alelo de 1000 bp presente en variedades picantes como SCM334. Estos datos parecen indicar que este gen no tiene ningún efecto en el carácter picante de ecotipos gallegos y vascos, que parece estar más influenciado por el gen Pun1.

El marcador p-AMT está asociado al gen de la aminotransferasa que cataliza la transformación de vanillina en vanillilamina en la ruta de biosíntesis de capsicina (Curry *et al.* 1999). La pérdida de función de este gen lleva a una modificación de la ruta y por tanto a una mayor síntesis de compuestos equivalentes a la capsicina pero no pungentes (capsinoides) (Tanaka *et al.* 2010). La ausencia del lugar de restricción, lo cual ha sido una característica común en los genotipos gallegos y vascos, indica que este gen es funcional en los ecotipos evaluados y que por tanto probablemente no presenten elevadas cantidades de capsinoides.

Dentro de los marcadores de tipo microsatélite, se detectaron un total de 80 alelos en los 34 genotipos analizados, con un tamaño variable de 113 a 349 bp. El número de alelos por locus varió de 2 (en el marcador CP10023) a 10 (en el marcador GPMS-197), con una media de 6,15 alelos por locus (Tabla 4.3). Se registró también la presencia de alelos nulos en 9 microsatélites (Hpms1-173, GP20068, CP10023, Hpms1-5, CAMS-405, Hpms1-143, CAMS-647, GPMS-197 y GMPS-117), la mayoría de los cuales eran pertenecientes al grupo de los "no annum". Esto es debido a que son especies distintas con respecto al resto de grupos (ecotipos gallegos, vascos y comerciales), que por lo tanto han evolucionado de forma totalmente diferente (Ince, 2010).

Tabla 4.3 Número de alelos detectados, rango de tamaño de los alelos de cada locus, frecuencia del alelo más representado, Polymorphism Information Content (PIC) e índice de diversidad para los 13 marcadores microsatélite incluidos en el análisis.

SSR	Nº Alelos	Rango (bp)	Frecuencia alélica	PIC	Gene diversity
Hpms1-173	9	173 - 197	34,38 %	0,780	0,815
CA514272	6	256 - 276	67,65 %	0,491	0,523
Hpms1-139	7	303 - 326	47,06 %	0,661	0,709
GP20068	4	113 - 139	57,14%	0,515	0,590
CP10023	2	192 - 196	93,33 %	0,117	0,127
AGi021	3	310 - 318	94,12 %	0,109	0,114
Hpms1-5	8	300 - 340	50,00 %	0,615	0,673
Hpms2-24	8	185 - 219	35,29 %	0,647	0,706
CAMS-405	6	242 - 262	34,38 %	0,714	0,766
Hpms1-143	4	224 - 242	81,48 %	0,301	0,327
CAMS-647	8	190 - 296	39,29 %	0,707	0,756
GPMS-197	10	291 - 349	26,67 %	0,824	0,856
GPMS-117	5	139 - 166	41,67 %	0,638	0,706
Media	6,15	-	54,04%	0,524	0,575

Los marcadores con mayor valor de PIC fueron el Hpms1-173, CAMS-405 y CAMS-647 PIC (0,780; 0,714 y 0,707 respectivamente). Por otro lado, los que menor PIC muestran son AGi021 y CP10023 (0,109 y 0,117, respectivamente); estando la media del PIC de todos los marcadores empleados en este estudio en 0,524 (Tabla 4.3). Las frecuencias alélicas mostradas por los distintos marcadores muestran la existencia de alelos muy dominantes, con valores en torno al 80 - 90% de frecuencia y la presencia de alelos que, aún siendo los que presentan mayor frecuencia con respecto a otros alelos de ese locus, no sobrepasan el 35%. (Tabla 4.3)

Los resultados obtenidos para el número de alelos, frecuencias alélicas y valor de PIC coinciden en su mayoría con los datos obtenidos en las publicaciones donde se describen estos marcadores y que a su vez emplean otras colecciones de distintas especies del género *Capsicum* (Lee *et al.* 2004; Minamiyama *et al.* 2006; Nagy *et al.* 2007; Ince *et al.* 2010).

Los índices de diversidad calculados para cada microsatélite, mostraron valores relativamente altos y su valor incrementa al aumentar el número de alelos detectados por locus. Se encontró un coeficiente de correlación de 0,89 entre estos dos parámetros,

lo cual resulta habitual en estudios de colecciones de germoplasma (Huang *et al.* 2002; Mazzucato *et al.* 2008; Pacheco-Olvera *et al.* 2012).

Con el fin de caracterizar la diversidad genética asociada a cada grupo de variedades establecidos *a priori*, se calculó el número total de alelos, el número de alelos por locus y su índice de diversidad (Tabla 4.4). Tanto el número de alelos totales como el número de alelos por locus es superior en el grupo de las "no annuum" (61 y 3,93, respectivamente), seguido de los pimientos comerciales; mientras que en el caso de los ecotipos gallegos y vascos este valor es sustancialmente inferior (Tabla 4.4). Dentro de la gran diversidad de alelos detectados, podemos ver que algunos alelos son muy representativos, dado que aparecen en prácticamente todos los genotipos estudiados, el caso más significativo es el del alelo de 276 bp del marcador CA514272 y el alelo de 242 bp del marcador Hpms1-143, ambos alelos han sido detectados en todos los genotipos de los ecotipos gallegos y vascos y en todos los genotipos comerciales excepto en PI201234 y SCM334. Este es un ejemplo de similitud perfecta, pero también hay alelos cuya representación, centrándonos en los ecotipos gallegos y vascos, abarca la totalidad de los genotipos, como por ejemplo los alelos de 196 bp y 314 bp de CP10023 y AGi021, respectivamente, presentes en todos los genotipos gallegos, vascos y comerciales, diferenciándose en su presencia en el grupo "no annuum". También aparecen marcadores en los cuales la representación alélica queda repartida entre muchos alelos (CAMS-647, GMPS-197 y GPMS-117), u otros en los que, por ejemplo Hpms1-5 y Hpms2-24, los genotipos gallegos y vascos quedan repartidos entre dos alelos (334, 336 bp y 203, 219 bp; respectivamente). La ausencia de alelos específicos en los grupos gallego y vasco apunta a la posibilidad de que los dos grupos de germoplasma tengan orígenes similares, o se hayan separado en una época relativamente cercana.

En cuanto al índice de diversidad, se observó que este es muy superior en las "no annuum", lo cual es lógico considerando que este grupo está formado por individuos de diferentes especies. El valor del índice de diversidad va disminuyendo en las comerciales y en los ecotipos gallegos y vascos, presentando estos dos últimos grupos valores muy inferiores y prácticamente similares (Tabla 4.4). Estos valores reflejan el buen resultado del análisis ya que es lógico que los ecotipos gallegos y vascos tengan menor índice de diversidad, puesto que son genotipos cuya distribución geográfica y

ambiental es mucho más limitada, estando circunscritos a pequeñas regiones localizadas en el norte de España.

Tabla 4.4. Número de alelos totales, número de alelos por locus e índices de diversidad en los grupos de pimientos establecidos *a priori*.

	Nº Genotipos	Nº Alelos totales	Nº alelos por loci	Índice de diversidad
Gallegas	10	36	2,33	0,3506
Vascas	6	30	1,93	0,3467
Comerciales	8	42	2,73	0,5029
No annuum	10	61	3,93	0,6798

4.2.3. Análisis de clúster

A partir de la matriz de similitudes calculada con el coeficiente de Dice para el conjunto de los 34 genotipos analizados, se realizó un análisis de clúster según el método UPGMA, que se representó con un dendograma (Figura 4.8). Eligiendo subjetivamente el punto de corte a una similitud de 0,58, se pueden distinguir tres grupos:

Grupo I: Formado por 16 genotipos, dentro del cual están todos los ecotipos gallegos, excepto Mougán, 2 ecotipos vascos (Corigero y Loyola) y tres comerciales (Yolo Wonder, Lamuyo e Italiano)

Grupo II: Compuesto por 7 genotipos, estando mayoritariamente representado por genotipos vascos (Orozco, Ibarra, Gernika y Piquillo), junto con dos comerciales (P. comercial y Cayena) y Mougán

Grupo III: Es un conjunto de genotipos "no annuum" aislados, junto con tres genotipos comerciales (Peperone, PI201234 y SCM334). Dentro de este conjunto se pueden ver algunos subgrupos cuanto menos curiosos, por ejemplo se puede observar a una distancia aproximada de 0,65 al subgrupo formado por *C. praetermissum* y *C. eximium* el cual puede estar relacionado con su condición de especies no domesticadas; también podemos ver el subgrupo formado por PI201234 y SCM334, dos ecotipos comerciales.

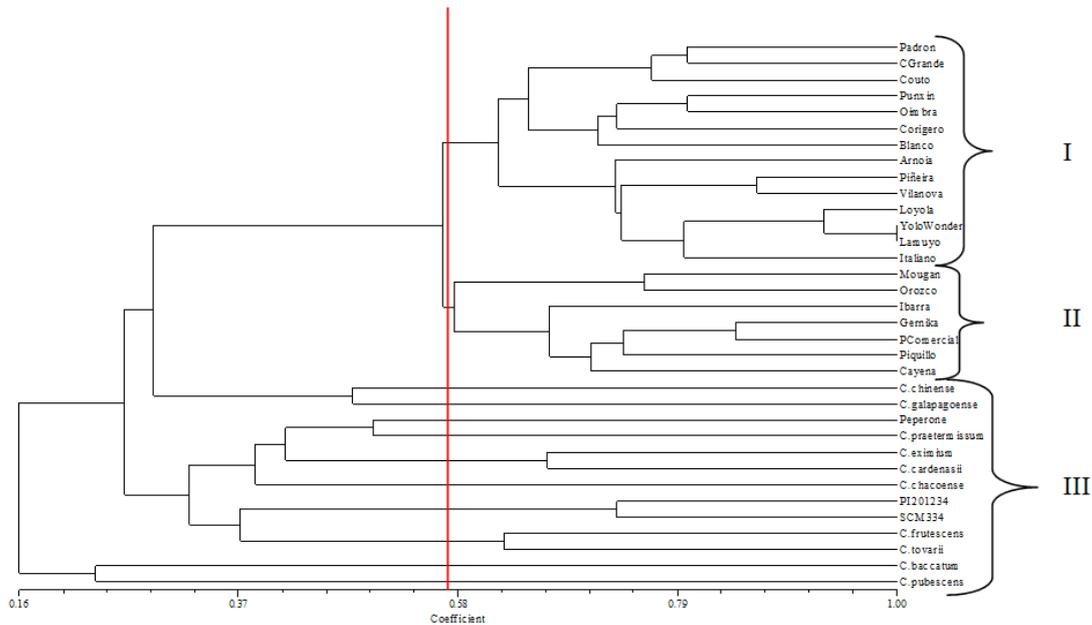


Figura 4.8 Análisis clúster empleando los cuatro grupos de estudio establecidos *a priori* (gallegos, vascos, comerciales y "no annum")

4.2.4 Análisis de coordenadas principales

La matriz de distancias, calculada anteriormente, se examinó también mediante un análisis de coordenadas principales. Este análisis permite ilustrar mejor los ejes principales de variabilidad entre los genotipos, reflejando su ordenación en el espacio (Figura 4.9).

Las dos primeras coordenadas resultantes de éste análisis explicaron un porcentaje no demasiado grande de la totalidad de la diversidad genética (30.8%). La coordenada I explicó el 20.5% de la variabilidad y separa principalmente los genotipos "no annum" del resto de grupos establecidos *a priori*, de igual modo que ocurría en el análisis de clúster realizado anteriormente. La coordenada II explica un 10.3% de la variabilidad y separa ligeramente a ecotipos gallegos y vascos, estando entremezclados los comerciales en ambos casos.

Podemos ver como la coordenada 1 nos agrupa y a la vez separa a los genotipos pertenecientes al grupo establecido *a priori* de los "no annum", del resto de grupos, de igual modo que en el análisis de clúster anteriormente realizado. La coordenada 2 nos

permite discernir ligeramente entre los ecotipos gallegos y vascos, estando entremezclados los comerciales en ambos casos.

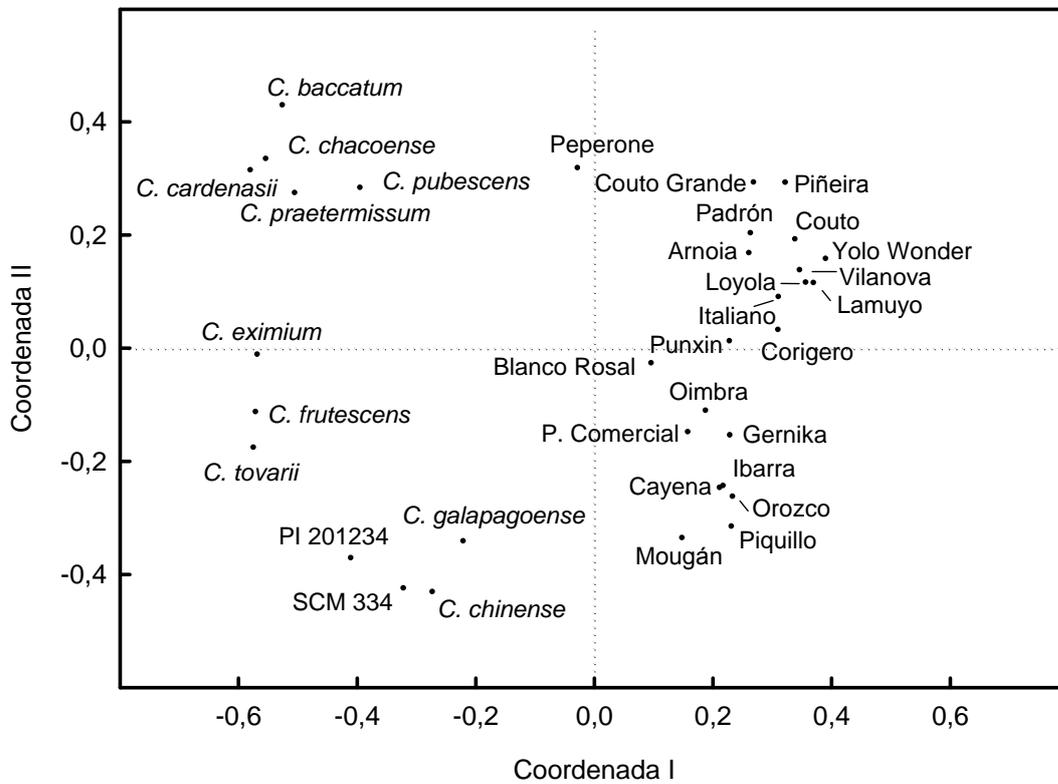


Figura 4.9 Análisis de coordenadas principales realizado a partir de un matriz de similitud obtenida con el coeficiente de Dice (Nei y Li, 1979) para los 34 genotipos analizados con 14 marcadores.

5. CONCLUSIONES

Los caracteres cualitativos estudiados mostraron una gran heterogeneidad entre los grupos establecidos *a priori* (gallegos y vascos), siendo la forma y el color del fruto, así como la forma del ápice completamente diferentes en cada una de estas dos poblaciones.

El análisis de componentes principales realizado sobre el conjunto de caracteres cuantitativos permitió agrupar las variables de estudio en 3 componentes que explican el 80% de la varianza existente. La proyección de los ecotipos gallegos y vascos sobre los dos primeros componentes sirvió para separar las diferentes líneas en función de las "dimensiones del fruto" y de las "dimensiones de la planta".

La puesta a punto y la optimización de la tecnología de marcaje con M13 para la detección de marcadores microsatélites en pimiento ha sido muy satisfactoria, ya que la mayoría de los marcadores empleados en este estudio han amplificado y han sido detectados correctamente en el analizador genético.

El dendrograma elaborado a partir de la matriz de similitudes genéticas permitió ver que los genotipos estudiados no se agrupan claramente según la división establecida *a priori*, si bien han mostrado la clara diferencia existente entre los pimientos del grupo "no *annuum*" con respecto a cualquiera de los tres grupos de pimientos pertenecientes a la especie *Capsicum annuum* (ecotipos gallegos, ecotipos vascos y variedades comerciales). El análisis en coordenadas principales confirmó los resultados obtenidos en el análisis de clúster.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Andrews, J** (1984) Peppers: The domesticated Capsicums. Fondo de cultura económica.
- **Baldwin, S; Pither-Joyce, M; Wright, K; Chen, L; McCallum, J** (2012) Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations. *Molecular Breeding*. 30: 1401-1411.
- **Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 32: 314–331.
- **Brohede, J; y Ellegren, H** (1999) Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Process of Biology Science* 266: 825-833.
- **Cornide, MT; Arencibia, A; Berovides, V; Calvo, D; Canales, E; Coto, O; González, C; Rodríguez, M; Sánchez, J; Sigarrosa, A; Xiqués, X** (2002) Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana. Cuba.
- **Eshbaugh, WH; Smith, PG; Nickrent, DL** (1983) *Capsicum tovarii* (Solanaceae), a new species of pepper from Perú. *Brittonia*. 35: 55 – 60.
- **Garcés Claver, A.** (2007) Estudio de los componentes del carácter picante en pimiento (*Capsicum* spp.): Técnicas de evaluación, análisis genético y molecular. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA).
- **Goldstein, DB, Pollock, DD** (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *The Journal of Heredity*. 88: 335 – 342.
- **Govindarajan VS** (1985) *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. Part I: history, botany, cultivation, and primary processing. *CRC Crit Rev Food Sci Nut*. 22: 109-176
- **Huang XQ, Börner A, Röder MS, Ganai MW** (2002) Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical & Applied Genetics*. 105: 531-536.

- **Ince, AG; Karaca, M; Onus, AN** (2010) Polymorphic microsatellite markers transferible across *Capsicum* species. *Plant molecular biology reporter*. 28: 285-291.
- **Ince, AG; Karaca, M; Onus, AN** (2010) Genetic relationships within an between *Capsicum* species. *Biochemical genetics*. 48: 83-95.
- **Jung, JM; Park, SW; Liu, WY; Kang, BC** (2010) Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum annuum* and SNP markers for cultivar identification. *Euphyca*. 175: 91-107.
- **Kaiser, HF** (1960). The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*. 20: 141-151.
- **Lee, JM; Nahm, SH; Kim, YM; Kim, BD.** (2004) Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and applied genetics*. 108: 619-627.
- **Liu, Z; Guo, R; Zhao, J; Cai, Y; Wang, F; Cao, M; Wang, R; Shi, Y; Song, Y; Wang, T; Li, Y** (2009) Genetic diversity of two important groups of maize landraces with same name in China revealed by M13 tailed-primer SSRs.. *Agricultural Sciences in China* 8: 15-23.
- **Mazzucato, A; Papa, R; Bitocchi E; Mosconi, P; Nanni, L; Negri, V; Enea, M; Siligato, F; Soressi, GP; Tiranti, B; Veronesi, F** (2008) Genetic diversity, structure and maker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor Appl Genet*. 116: 657-669.
- **Mc Leod, MJ; Guttman, SI; Eshbaugh, WH** (1983) An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution*. 37: 562 – 574.
- **Metzgar, D; Bytof, J; Will, C** (2000) Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72-80.
- **Minamiyama, Y; Tsuru, M; Hirai, M.** (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum* L. *Molecular breeding*. 18: 157-159.
- **Morgante, M; Hanafey, M; Powell, W** (2002) Microsatellites are preferentially associate with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*. 30: 194 – 200.
- **Moscone, EA; Loidl, J; Ehrendorfer, F** (1995) *American Journal of Botany*. 82: 276 – 287.

- **Moscone, EA; Baranyi, M; Ebert, I** (2003) *Annals of Botany*. 92: 21 – 29.
- **Nagy, I; Stágel, A; Sasvári, Z; Roder, M; Ganal, M.** (2007) Development, characterization and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.) *Genome*. 50: 668-688.
- **Nei, M** (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- **Nei, M; Li, WH** (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269–5273.
- **Nuez, F.; Gil Ortega, R.; Costa, J** (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Ediciones Mundi-Prensa.
- **Oetting, W. S., H. K. Lee, D. J. Flanders, G. L. Wiesner, T. A. Sellers, and R. A. King** (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*. 30: 450 - 458.
- **Pacheco-Olvera, A; Hernández-Verdugo, S; Rocha-Ramírez, V; González-Rodríguez, A, Oyama, K.** (2012) Genetic diversity and structure of pepper (*Capsicum annuum* L.) from Northwestern Mexico analyzed by microsatellite markers. *Crop Science*. 52: 231-241.
- **Phillips, W; Rodriguez, H y Fritz, P** (1995) *Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (Theobroma cacao)*. Serie Técnica. Informe técnico 252. CATIE, Turrialba, Costa Rica, pp: 183.
- **Portis, E; Nagy, I; Sasvári, Z; Stágel, A; Barchi, L; Lanteri, S.** (2007) The design of *Capsicum* spp. SRR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant science*. 172: 640-648.
- **Powell, W** (1992) *Plant genomes, gene markers, and linkage maps*. En: *Biotechnology and crop improvement in Asia*, Ed. Moss, JP, Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, pp: 297-322.
- **Rohlf FJ** (2000). *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy System*. Ver. 2.1. Exeter Software, Setauket, NY, USA. 29-34.

- **Rodríguez Bao, JM; Terren Poves, L; Rivera-Martínez, A; Andrés-Ares, JL y Fernández-Paz, J** (2004). Pimientos autóctonos de Galicia. *Horticultura Internacional*. 43: 34-40.
- **Saiki, RK; Gelfand, DH; Stoffel, S; Scarf, S; Higuchi, R; Horn, GT; Mullis, KB; Erlich, HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termoestable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- **Salleres Neira, M^a B.** (2010) Utilización de Marcadores Moleculares para la Selección y Disección de Caracteres Cuantitativos de Maíz Grano y Forrajero en las Zonas Húmedas de España. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).
- **Santra, DK; Chen, XM; Santra, M; Campbell, KG; Kidwell, KK.** (2008) Identification and mapping QTL for high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Stephens. *Theor. Appl. Genet.* 117: 793 - 802.
- **Schuelke, M** (2000) An economic method for the fluorescent labeling PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18: 233-234.
- **Stellari, GM; Mazourek, M; Jahn, MM** (2010) Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104:460-71.
- **Tanaka, Y; Hosokawa, M; Miwa, T; Watanabe, T; Yazawa, S** (2010). Novel loss-of-function putative aminotransferase alleles cause biosynthesis of capsinoids, nonpungent capsaicinoid analogues, in mildly pungent chili peppers (*Capsicum chinense*). *J Agric Food Chem.* 58(22):11762-7.
- **Tanksley, SD** (1983) Molecular markers in plant breeding. *Annual Review of Genetics* 27: 205-233.
- **Tautz, D; Trick, M; Dover, G.** (1986) Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-653.
- **Valadez, ME; Kahl, G.** (2000) Huellas de DNA en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-Prensa, Mexico, D.F.
- **Walsh, BM; Hoot, SB** (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two recording regions: The chloroplast

atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. International Journal of Plant Sciences. 162: 1409 – 1418.

7. ANEXOS

Anexo I

Descriptores de la planta para el género *Capsicum*:

- Datos agronómicos cuantitativos:
 - a. Ancho de la planta (cm): Se mide inmediatamente después de la primera cosecha, en el punto más ancho.
 - b. Longitud del tallo (cm) Se mide hasta la primera bifurcación, inmediatamente después de la primera cosecha.
 - c. Diámetro del tallo (cm): Se mide en la parte del medio hasta la primera bifurcación, inmediatamente después de la primera cosecha.
 - d. Altura de la planta (cm): Se registra cuando comienza a madurar el primer fruto en el 50% de las plantas.
 - e. Longitud del fruto (cm): Promedio de 10 frutos maduros de la segunda cosecha.
 - f. Ancho del fruto (cm): Promedio de 10 frutos maduros de la segunda cosecha.
 - g. Peso del fruto (g): Promedio del peso de 10 frutos maduros de la segunda cosecha.
 - h. Longitud del pedicelo del fruto (cm): Promedio de la longitud de 10 pedicelos de la segunda cosecha medida hasta un lugar decimal.
 - i. Espesor de la pared del fruto 25 (mm): Promedio del espesor de 10 frutos maduros de la segunda cosecha, medido en el punto más ancho hasta un lugar decimal.
 - j. Número de lóculos: Observar 10 frutos, si el número de lóculos (cámara) es uniforme, regístrelo; si no, registre los dos números más frecuentes (o el porcentaje de todas las categorías).
 - k. Longitud de la placenta

- Datos agronómicos cualitativos
 - a. Color del fruto en estado maduro:
 - 1- Blanco
 - 2- Amarillo-limón
 - 3- Amarillo-naranja pálido
 - 4- Amarillo-naranja
 - 5- Naranja pálido
 - 6- Naranja
 - 7- Rojo claro
 - 8- Rojo
 - 9- Rojo oscuro
 - 10- Morado
 - 11- Marrón
 - 12- Negro
 - 13- Otro
 - b. Forma del fruto
 - 1- Elongado
 - 2- Casi redondo
 - 3- Triangular
 - 4- Acampanulado
 - 5- Acampanulado y en bloque
 - 6- Otro
 - c. Cuello en la base del fruto
 - 0- Ausente
 - 1- Presente
 - d. Forma del ápice del fruto
 - 1- Puntudo
 - 2- Romo
 - 3- Hundido
 - 4- Hundido y puntudo
 - 5- Otro
 - e. Apéndice en el fruto, vestigio de la floración
 - 0- Ausente
 - 1- Presente
 - f. Arrugamiento transversal del fruto: Promedio de 10 frutos, (un tercio desde el final del pedicelo)
 - 3- Levemente corrugado
 - 5- Intermedio
 - 7- Muy corrugado

Anexo II

Análisis de varianza para 11 caracteres agromorfológicos evaluados en 16 ecotipos de pimiento de Galicia y País Vasco

Variable dependiente: Ancho_planta

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	15197,641*	13	1169,049	10,193	,000
Intersección	1642806,654	1	1642806,654	14324,367	,000
Variedad	15197,641	13	1169,049	10,193	,000
Error	43007,310	375	114,686		
Total	1720634,000	389			
Total corregida	58204,951	388			

a. R cuadrado = ,261 (R cuadrado corregida = ,235)

Variable dependiente: Longitud_planta

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	12586,652*	13	968,204	75,257	,000
Intersección	219992,484	1	219992,484	17099,725	,000
Variedad	12586,652	13	968,204	75,257	,000
Error	4824,474	375	12,865		
Total	242773,000	389			
Total corregida	17411,126	388			

a. R cuadrado = ,723 (R cuadrado corregida = ,713)

Variable dependiente: Diametro_planta

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	16,856*	13	1,297	19,027	,000
Intersección	1186,023	1	1186,023	17404,076	,000
Variedad	16,856	13	1,297	19,027	,000
Error	25,555	375	,068		
Total	1235,824	389			
Total corregida	42,411	388			

a. R cuadrado = ,397 (R cuadrado corregida = ,377)

Variable dependiente: Altura_planta

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	76779,088*	13	5906,084	34,020	,000
Intersección	5094143,916	1	5094143,916	29343,469	,000
Variedad	76779,088	13	5906,084	34,020	,000
Error	65101,503	375	173,604		
Total	5312659,000	389			
Total corregida	141880,591	388			

a. R cuadrado = ,541 (R cuadrado corregida = ,525)

Variable dependiente: Longitud_fruto

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2573,638*	13	197,972	87,977	,000
Intersección	42276,369	1	42276,369	18787,307	,000
Variedad	2573,638	13	197,972	87,977	,000
Error	864,101	384	2,250		
Total	46439,671	398			
Total corregida	3437,738	397			

a. R cuadrado = ,749 (R cuadrado corregida = ,740)

Variable dependiente: Ancho_fruto

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1193,333*	13	91,795	165,948	,000
Intersección	10244,711	1	10244,711	18520,564	,000
Variedad	1193,333	13	91,795	165,948	,000
Error	211,858	383	,553		
Total	11502,936	397			
Total corregida	1405,191	396			

a. R cuadrado = ,849 (R cuadrado corregida = ,844)

Variable dependiente: Peso_fruto

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,232E6	13	94765,240	72,207	,000
Intersección	2590992,106	1	2590992,106	1974,232	,000
Variedad	1231948,114	13	94765,240	72,207	,000
Error	503963,671	384	1312,405		
Total	4216474,998	398			
Total corregida	1735911,784	397			

a. R cuadrado = ,710 (R cuadrado corregida = ,700)

Variable dependiente: Longitud_pedicelo

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	161,601*	13	12,431	22,036	,000
Intersección	7172,186	1	7172,186	12713,918	,000
Variedad	161,601	13	12,431	22,036	,000
Error	214,930	381	,564		
Total	7685,672	395			
Total corregida	376,531	394			

a. R cuadrado = ,429 (R cuadrado corregida = ,410)

Variable dependiente: Pared fruto

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1203,937*	13	92,611	75,505	,000
Intersección	6063,366	1	6063,366	4943,410	,000
Variedad	1203,937	13	92,611	75,505	,000
Error	470,997	384	1,227		
Total	7588,003	398			
Total corregida	1674,934	397			

a. R cuadrado = ,719 (R cuadrado corregida = ,709)

Variable dependiente: Numero loculos

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	116,293*	13	8,946	25,587	,000
Intersección	4123,480	1	4123,480	11794,538	,000
Variedad	116,293	13	8,946	25,587	,000
Error	134,250	384	,350		
Total	4380,000	398			
Total corregida	250,543	397			

a. R cuadrado = ,464 (R cuadrado corregida = ,446)

Variable dependiente: Longitud placenta

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	38905,899*	13	2992,761	78,064	,000
Intersección	242486,791	1	242486,791	6325,111	,000
Variedad	38905,899	13	2992,761	78,064	,000
Error	14683,131	383	38,337		
Total	301967,095	397			
Total corregida	53589,030	396			

a. R cuadrado = ,726 (R cuadrado corregida = ,717)