

## **METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN NÚCLEO DEL GERMOPLASMA DEL GÉNERO *CAPSICUM* (AJÍES Y PIMIENTOS)**

**Odalys Barrios, Zoila Fundora, Tomás Shagarosdsky, Raúl Cristóbal, Gloria Acuña, Sergio Abreu y Dalila de Armas**

***Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. INIFAT*  
*obarrios@inifat.co.cu***

### **RESUMEN**

La colección núcleo se compone de una muestra representativa de la variabilidad de la colección base, con un mínimo de redundancia. Se tomó como punto de partida la información de caracterización y evaluación de 255 accesiones y 22 caracteres morfoagronómicos de la colección base. Se propuso la siguiente metodología de trabajo: 1ro. Análisis Factorial de Correspondencias para seleccionar los caracteres de mayor importancia (13 caracteres). 2do. Análisis de Conglomerados con los 13 caracteres seleccionados, utilizando el agrupamiento de Ward que generó un dendrograma con ocho clases. 3ro. Selección de las especies (*Capsicum annuum-chinense-frutescens*) en cada clase (193 accesiones) y selección de los cultivares dentro de las especies en cada clase (139 accesiones). 4to. Selección de la cantidad de accesiones por cada cultivar, se tuvo en cuenta: participación del mejorador en el proceso de selección; atributos agronómicos y uso; incidencia del virus (TEV), variabilidad morfológica poco frecuente, peligro de erosión genética y procedencia geográfica (83 accesiones). 5to. Comprobar la selección adecuada de las accesiones con criterios sobre diversidad molecular (distancia genética de Dice), para corroborar disimilaridad entre las accesiones (50 accesiones). 6to. Comprobar la representatividad de la variabilidad de la colección núcleo con respecto a la base, utilizando los coeficientes de Dhiwan y de correlación de Spearman. 7mo. Colección núcleo de *Capsicum* compuesta por 50 accesiones que indica que el 20% de la colección base contiene la variabilidad suficiente para formar la colección núcleo.

### **METHODOLOGY FOR THE ESTABLISHMENT OF THE CORE COLLECTION OF THE GERMPLASM OF *CAPSICUM* GENUS (PEPPERS)**

#### **ABSTRACT**

The core collection is composed of representative sample of the base collection variability, with a minimum redundancy. It took as initial point the information of characterization and evaluation of 255 accessions and 22 morfoagronomic characters of the base collection. It proposed the following working methodology: 1ro. Factorial Correspondences Analysis to select the more importance characters (13 characters). 2do. Clusters Analysis with the 13 selected characters, using the Ward's cluster, which generated a dendrogram with eight classes. 3ro. Selection of the

species (*Capsicum annum-chinense-frutescens*) in each class (193 accessions) and selection of the cultivars inside the species in each class (139 accessions). 4to. Selection of the accessions quantity for each cultivars, one kept in mind: participation of the breeder in the selection process; agronomic attributes and use; virus (TEV) incidence, strange variability, genetic erosion and geographical origin (83 accessions). 5to. To check the appropriate selection of the accessiones with use the molecular diversity approaches (Dice genetic distance), to corroborate accessions dissimilarities (50 accessions). 6to. To check the representativeness variability of the core collection/base collection, using the Dhiwan coefficients and Spearman correlation. 7mo. *Capsicum* core collection composed by 50 accessions that it indicates that 20% of the base collection contains enough variability to form the core collection.

## INTRODUCCIÓN

Las colecciones de germoplasma mantenidas *ex situ* han experimentado durante las tres últimas décadas un gran aumento en número y tamaño, como resultado del intenso trabajo realizado en el mundo para conservar los recursos fitogenéticos. El manejo adecuado del germoplasma es de gran importancia para el mantenimiento sostenible y la utilización óptima del germoplasma de alta calidad, Engels y Visser (2007).

Para mejorar el acceso a las colecciones de germoplasma, fue propuesta la selección de un pequeño número de accesiones de la colección base, que fueran representativas de la mayor diversidad posible de un cultivo, y a esta muestra se denominó, colección núcleo. Este concepto ha cambiado desde su definición original por Frankel y Brown (1984), que denominaba a una colección núcleo como un conjunto limitado de accesiones que, empleando un mínimo de repeticiones, representa la diversidad genética de una especie cultivada y de sus parientes silvestres. Brown (1995) indicó, de manera más práctica, que una colección núcleo consta de un número limitado de accesiones de una colección, que se escogen para representar el espectro genético de la misma, esta debe incluir el máximo de diversidad genética de la colección completa. Un enfoque más actual es el de colección núcleo sintética, que consiste de un número limitado de entradas, seleccionadas para representar la diversidad genética del cultivo, la cual puede estar integrada por muestras conservadas *in situ* (Van Hintum *et al.*, 2000).

La definición de la colección núcleo de las especies y cultivares de *Capsicum* conservados en el banco de germoplasma del INIFAT, constituye una demanda teniendo en cuenta la complejidad en el manejo de sus accesiones; debido fundamentalmente al sistema de reproducción autógamo-facultativo, lo que hace difícil su manejo en la fase de regeneración en campo, unido a problemas relacionados con la viabilidad de la semillas durante la conservación.

Por tal motivo se propuso como objetivo, definir una colección núcleo que permita el incremento de la utilidad de la colección para los curadores y mejoradores con un número manejable de

accesiones y un mínimo de redundancia; que haga más eficiente el mantenimiento y manejo del germoplasma de las especies de *Capsicum* presentes en Cuba.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio fue desarrollado a partir de la colección base de *Capsicum* que está compuesta por 255 accesiones, de ellas 110 pertenecen a la especie *C. annuum* L., 87 a *C. frutescens* L. y 58 a *C. chinense* Jacq. Para la caracterización y evaluación de las accesiones fueron empleados 22 descriptores (11 caracteres del fruto, 7 de la inflorescencia y 2 de susceptibilidad al estrés biológico, se tuvo en cuenta además, la especie y el estado de la muestra), lo que representó el 25% de los descriptores contemplados en el Listado de Descriptores Internacionales (IPGRI/AVRDC/CATIE; 1995) para este género.

### • Metodología para el establecimiento de la colección núcleo.

Se realizó inicialmente un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), que permitiera seleccionar los caracteres de mayor importancia. Posteriormente, utilizando los caracteres seleccionados como variables y las 255 accesiones como observaciones, se empleó un Análisis de Conglomerados, utilizando como coeficiente de distancia, la Euclidiana, y como criterio de agregación, el agrupamiento jerárquico de Ward, que generó un dendrograma donde se visualizó la formación de las clases. Este agrupamiento ha sido recomendado por Crossa *et al.* (1995) y Tapia (2003), para el estudio de colecciones núcleo, que permite maximizar las diferencias entre las clases y minimizarlas dentro de ellas. Balakrishnan y Nair (2003), probaron este método de estratificación, basado en el estudio de la colección base con un conjunto de conglomerados con variables múltiples, utilizando datos de evaluación cuantitativos y morfológicos.

Se utilizaron los siguientes criterios para la selección de la colección núcleo, con el enfoque de selección estratificada, asistida por el curador de la colección:

1. Los grupos que reflejan una división natural entre accesiones basados en diferencias morfológicas, agronómicas y de origen, cuidando que no se solapen las accesiones de acuerdo con su distribución geográfica, pues la insuficiente representación geográfica es uno de los factores limitantes para el uso extensivo y efectivo de una colección núcleo (Brown, 1989; Polignano *et al.*, 2001).
2. Participación del mejorador en el proceso de selección de la colección núcleo (Malosetti *et al.*, 2000).
3. Cruzamiento natural presente en el género, nueva variabilidad detectada, cultivares en peligro de erosión genética e incidencia de enfermedades (Barrios *et al.*, 2007; 2008).

4. Criterios referentes a la diversidad molecular presente en la colección nacional de *Capsicum* caracterizada con marcadores AFLP (Barrios *et al.*; 2005)
5. Análisis de la matriz de distancia genética de Dice (1945) para comprobar la disimilaridad genética entre las accesiones seleccionadas.

Teniendo en cuenta algunos de los caracteres morfológicos que aportaron las mayores contribuciones a la variabilidad en el AFC, se analizó la representatividad de la variabilidad contenida en la colección núcleo con respecto a la presente en la colección base, a través de los rangos retenidos de las variables originales (máximo-mínimo para cada carácter) y los coeficientes de variación (CV) respectivamente, para el caso de los caracteres cuantitativos. Este análisis se realizó a partir de la estimación de los coeficientes de Dhiwan (Dhiwan *et al.*, 1995), y Dhiwan modificado, en este caso se determinó el promedio de la variabilidad retenida usando los coeficientes de variación (Fundora *et al.*, 2007). En el caso de los caracteres cualitativos, se estimaron las coincidencias utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (Fundora *et al.*, 2007), y se analizó la frecuencia en forma gráfica. Para realizar los cálculos en los datos originales, se utilizaron los paquetes estadísticos Statgraphics Plus versión 5.0 y SSPS versión 11.5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El AFC realizado para la colección base aportó el 62% de la variabilidad acumulada en los seis primeros factores. Se destacaron 13 caracteres por su mayor contribución a la variabilidad total, de ellos seis caracteres en el primer factor y tres en el segundo; el resto de la variabilidad estuvo distribuida en el resto de los factores (Tabla 1).

El Análisis de Conglomerados realizado con los 13 caracteres seleccionados previamente, condujo a la formación de ocho clases, con un umbral de corte de 40. El dendrograma construido utilizando el agrupamiento de Ward permitió visualizar las diferencias entre las clases (Figura 1). La descripción de las clases se ofrece en la Tabla 2, teniendo en cuenta la especie y los cultivares pertenecientes a cada una, así como la cantidad y porcentaje que representan dentro de cada clase.

- **Pasos para la selección de la colección núcleo.**

### 1. Selección de las especies en cada clase.

Se detectó que las clases estuvieron integradas por más de una especie, lo que evidenció la presencia de accesiones con caracteres morfológicos intermedios, debido posiblemente al sistema de reproducción de la planta, que permite la hibridación entre y dentro de las especies de *Capsicum*. Se debe destacar que las accesiones que componen la colección base provienen en gran medida de la colecta y se desconoce el nivel de variación intrapoblacional con el que se colectó cada muestra. La mayoría de los agricultores que se dedican al cultivo de los ajíes y

pimientos, ignoran el fenómeno de la polinización cruzada, lo que ha propiciado que en muchos casos una nueva variabilidad sea introducida, como ocurre con de los 'cultivares locales híbridos' surgidos de manera espontánea que aparecen en la Clase 7. Considerando los elementos anteriores, se seleccionaron inicialmente de las ocho clases, las especies que tuvieron mayor representatividad (%) en cada clase, lo que sumó un total de 193 accesiones, que representó el 75% de la colección base. La selección inicial de la cantidad de accesiones por cada clase aparece señalado con las siglas (SI) en la Tabla 2.

## **2. Selección de cultivares dentro de las especies en cada clase.**

Fueron identificados los cultivares representativos de las tres especies dentro de cada clase, teniendo en cuenta que la frecuencia de aparición del cultivar (%) fuera mayor en la clase seleccionada, lo que propició que la elección estuviera dirigida hacia accesiones con un mínimo de mezcla varietal, en el caso de que esta variabilidad no fuera deseada. De esta manera se hizo una selección preliminar de 139 accesiones, que representó el 55% de la colección base, (Tabla 3).

## **3. Selección de la cantidad de accesiones por cada cultivar.**

Para la elección de las accesiones que integrarían la colección núcleo, se partió de las 139 escogidas anteriormente y fueron aplicados los siguientes criterios de selección:

- Atributos agronómicos favorables y diferentes propósitos de uso teniendo en cuenta la pungencia del fruto (consumo fresco, condimento, encurtido, ornamental y medicinal).
- Incidencia del virus del Grabado del Tabaco (TEV), variable de importancia en las producciones de ajíes y pimientos en nuestras condiciones según Depestre (1999); Barrios (2008) y por la contribución de esta variable a la variabilidad total reflejada en el AFC.
- Variabilidad morfológica poco frecuente que resultara de interés, que había sido detectada y que debía ser conservada.
- Evidencia del peligro de erosión genética en algunos cultivares, particularmente de accesiones que han sido colectadas como poblaciones naturales.
- Procedencia geográfica de las accesiones, con vistas a evitar redundancias en el proceso de selección.

## **4. Comprobación de la selección adecuada de las accesiones, con la información procedente del estudio de diversidad genética con marcadores moleculares AFLP.**

Basados en los elementos citados, se seleccionaron *a priori* 83 accesiones lo que representó el 33% de la colección base con posibilidades para integrar la colección núcleo, y se corroboró esta selección con el estudio de marcadores moleculares realizado en la colección *ex situ* de *Capsicum* y la matriz de distancia genética entre accesiones.

Se comprobó primeramente la distancia genética entre las accesiones de la colección base que fueron seleccionadas para el estudio de diversidad molecular, este análisis fue factible solamente para aquellos casos, en los que se incluyó más de una accesión del mismo cultivar en el estudio con marcadores AFLP. En la Tabla 4 aparecen los valores de distancia genética alcanzados entre las accesiones de 10 de los cultivares que pudieron ser comparados; de cualquier manera se procuró incluir en la colección núcleo, la mayor parte de los cultivares que habían sido sometidos a este estudio, aunque solo estuvieran representados por una accesión, estos 11 cultivares aparecen simbolizados (\*) en la Tabla 3. Se determinó incluir estos cultivares en la colección núcleo, porque este análisis permitió corroborar la validez de la identificación taxonómica de las accesiones y evidenció la presencia de una estructura genética definida en las muestras, que sugirió la ausencia de variación intrapoblacional en las accesiones, la cual es causada por el cruzamiento natural presente entre especies y cultivares del género.

Aunque nueve accesiones carecían de información molecular, de cinco de ellas (señaladas en la Tabla 3 con las siglas (AU), solo existían muestras únicas en la colección base y cuatro eran 'cultivares locales híbridos' surgidos como consecuencia de la hibridación espontánea en sistemas de agricultura tradicional, los cuales eran aprovechados por los miembros de la comunidad para el consumo familiar. Por el valor de uso de estos cultivares, así como por el peligro que representa la erosión de esta variabilidad única, los mismos fueron seleccionados para formar parte de la nueva colección.

#### **5. Comprobación de la variabilidad retenida en las accesiones seleccionadas para conformar la colección núcleo.**

Se eligieron 50 accesiones, lo que representa un 20% de la colección base, y se comprobó si este sub-conjunto contenía la variabilidad suficiente para conformar la colección núcleo.

En el caso de los caracteres cuantitativos analizados el promedio de rangos retenidos osciló entre 13% y el 197%, sugiriendo este último valor que en la clase 7 prácticamente se duplicó el espectro de los mismos al seleccionar el núcleo, la retención total de los rangos en la colección núcleo fue efectiva, con valores de 74% (Tabla 5). La representatividad de los rangos retenidos en la colección núcleo, fue más baja en las clases 2, 3, 6 y 8 (13 a 39%), donde fueron seleccionadas la menor cantidad de accesiones (1-2). Esto sugiere que en las clases menos numerosas, se debe hacer un ejercicio más minucioso para la selección de las accesiones, cuidando de no afectar el rango de retención de variabilidad de los caracteres cuantitativos. Sin embargo, para los caracteres cualitativos, la retención fue muy efectiva ( $R_s=0.903^{**}$ ), significativo al 1% de probabilidad de error, indicando una adecuada representatividad de los mismos en la colección núcleo.

En las Figuras 2 y 3 se aprecia la representatividad de la variabilidad contenida en la colección núcleo con respecto a la colección base, de algunos de los caracteres que en el AFC mostraron

contribuciones de importancia a la variabilidad total. Se debe señalar que aunque lo idóneo debe ser crear una colección núcleo totalmente resistente a las enfermedades, no es absolutamente factible en muchos casos. De esta manera, se muestra en la Figura 2 como fue necesario seleccionar algunas accesiones con diferentes grados de resistencia al TEV en condiciones de infección natural. Resultó difícil prescindir de estas accesiones (12), el interés por conservarlas radicó en los diferentes propósitos de consumo, adaptación al medio con escasos requerimientos agrotécnicos y por lo tanto, su valor potencial para el mejoramiento, integrando posibles estrategias de resistencia en el cultivo.

#### **6. Distribución geográfica de la colección núcleo.**

La distribución geográfica de la nueva colección creada, indicó que está integrada mayoritariamente por accesiones colectadas a través de toda la Isla (Figura 3). Las provincias más representadas fueron Pinar del Río (36%), Cienfuegos (18%) y Guantánamo (10%); le siguen Ciudad de La Habana y Sancti Spíritus (6%). Del resto de las provincias solo se seleccionaron 1 ó 2 accesiones. Las accesiones procedentes de las tres provincias mencionadas inicialmente, estuvieron más representadas en la colección núcleo, considerando que estas provincias fueron ampliamente estudiadas durante la última década, como parte del estudio de conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos desarrollado en comunidades rurales de estas regiones de Cuba. Este estudio permitió identificar, por ejemplo, un acervo genético único en accesiones de *C. chinense* en localidades de Pinar del Río, así como parientes silvestres de *C. annum* y *C. chinense* en peligro de erosión y una variabilidad única y rara de cultivares de *C. annum-chinense-frutescens* que no estaba conservada en la colección *ex situ* de *Capsicum* del banco de germoplasma del INIFAT; por lo que esta diversidad, de interés agrícola integró la nueva colección creada. No fueron seleccionadas accesiones de las provincias de Villa Clara y Camagüey, por no exhibir las muestras evaluadas una variabilidad interesante que justificara su presencia en el núcleo.

#### **7. Descripción de la colección núcleo de las especies de *Capsicum* de Cuba.**

Finalmente se determinó que las 50 accesiones que habían sido previamente seleccionadas debían conformar la colección núcleo de *Capsicum*, por responder a los parámetros evaluados para el establecimiento de la misma. La nueva colección creada se compuso por 21 accesiones de *C. annum*, 7 de *C. frutescens* y 16 de *C. chinense*, la integraron además 6 'cultivares locales híbridos'. Las particularidades de la colección núcleo se reflejan en la Tabla 6.

Se comprobó que el muestreo estratificado fue adecuado para la selección de la colección núcleo, lo que coincide con lo planteado por Malosetti *et al.* (2000), sobre la importancia de este método de selección, que incluye la participación del mejorador en el proceso de selección como el más efectivo. Por tanto, metodologías como esta, que incluyen la participación de futuros usuarios, agregan información de valor que complementan al análisis estadístico, incrementando

la utilidad de la colección núcleo para sus usuarios directos (mejoradores y curadores), así la colección núcleo permite un acceso más fácil a su variabilidad.

### CONCLUSIONES

- La colección núcleo de las especies de *Capsicum* se compuso de 50 accesiones, lo que representó un 20% de la colección base. La colección núcleo establecida contuvo una variabilidad del 70% de la colección original.
- El método utilizado basado en el muestreo estratificado resultó efectivo la selección de la colección núcleo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Engels, J.M.M. y Visser, L. (eds). Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma. No.6:192 pp. ISBN: 978-92-9043-767-3. *Bioversity International*, Roma, Italia, 2007

Balakrishnan, R. y Nair, N.V. Strategies for developing core collections of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm-comparison of sampling from diversity groups constituted by three different methods. ***Plant Genetic Resources Newsletter***. 134: 33-41, 2003

Barrios, O.; Guzmán, F.; Fundora, Z.; Fuentes, V.; Shagarosky, T.; Cristóbal, R.; De Vicente, C.; Abreu, S. y Acuña, G. Distancia genética en poblaciones de *Capsicum* (ajíes y pimientos) utilizando marcadores AFLP. **Agrotecnia de Cuba**. Revista Digital, Número Especial, INIFAT, diciembre 2005, <http://www.fao.cu>, 2005

Barrios, O.; Fuentes, V.; Shagarosky, T.; Cristóbal, R.; Castiñeiras, L.; Fundora, Z.; García, M.; Giraudy, C.; Fernández, L.; León, N.; Fernández, F.; Moreno, V.; Arzola, D.; Acuña, G.; Abreu, S. y De Armas, D. Nuevas combinaciones híbridas de *Capsicum* spp. en sistemas de agricultura tradicional de occidente y oriente de Cuba. **Agrotecnia de Cuba**. 31 (2): 327-335, 2007

Barrios, O.; Cruz, B.; Acuña, G.; Abreu, S. y De Armas, D. Evaluación de la colección de germoplasma de *Capsicum* spp. frente al virus del Grabado del Tabaco. **Agrotecnia de Cuba**. 32 (1): 44-49, 2008

Brown, A.H.D. The case for core collection. En: Brown, A.H.D.; Frankel, O.H.; Marshall, D.R. y Williams, J.T. (eds.). The use of plant genetic resources. Cambridge Univ. Press, UK. pp: 136-156, 1989

Brown, A.H.D. The core collection at the crossroads. En: Hodgkin, T.; Brown, A.H.D.; Th. J.L. van Hintum y Morales, E.A.V. (eds.). Core collections of plant genetic resources. IPGRI, John Wiley & Sons, UK. pp: 3-19, 1995

Crossa, J.; DeLacy, I.H. y Taba, S. The use of multivariate methods in developing a core collection. En: Hodgkin, T.; Brown, A.H.D.; Th. J.L. van Hintum y Morales, E.A.V. (eds.). Core collections of plant genetic resources. IPGRI, John Wiley & Sons, UK. pp: 77-92, 1995

Depestre, T. An approach to pepper breeding in Cuba. ***Capsicum and Eggplant Newsletter***, 18: 16-20, 1999



Dhiwan, N.; McIntosh, M.S. y Baughan, G.R. Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. **Theor. Appl. Genet.** 90: 755-761, 1995

Frankel, O.H. y Brown, A.H.D. Current plant genetic resources-a critical appraisal. En: Genetics: New Frontiers (vol. IV) New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing, 1984

IPGRI/AVRDC/CATIE.Descriptores para *Capsicum spp.* IPGRI: Roma, Italia; AVRDC: Taipei, Taiwan y CATIE: Turrialba, Costa Rica. 51 pp, 1995

Malosetti, M., Abadie, T. y Germán, S. Comparing strategies for selecting a core subset for the Uruguay barley collection. **Plant Genetic Resources Newsletter.** 121: 20-26, 2000

Polignano, G.B.; Ugenti, P. y Scippa, G. Diversity analysis and core collection formation in Bari faba bean germplasm. **Plant Genetic Resources Newsletter.** 125: 33-38, 2001

Tapia, C. Análisis de la variabilidad genética de jícama. En: Análisis estadístico de los datos de caracterización morfológica de recursos genéticos. Boletín Técnico No. 8: 50-55, IPGRI, Cali, Colombia, ISBN 92-9043-543-7, 2003

Van Hintum Th.J.L.; Brown, A.H.D.; Spillane, C. y Hodgkin. T. Core Collections of Plant Genetic Resources. **IPGRI Technical Bulletin.** No. 3: 48 pp, 2000