

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

TRABAJO FIN DE MÁSTER: MEMORIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES: MÁSTER EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

CURSO 2019-2020: CONVOCATORIA NOVIEMBRE



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

MEJORA GENÉTICA DE *CAPSICUM* ASISTIDA POR MARCADORES

MOLECULARES: CARACTERES DEL FRUTO

MOLECULAR MARKER-ASSISTED BREEDING IN *CAPSICUM*: FRUIT TRAITS

Mónica Yagüe Sancho

Director: Juan Capel Salinas

ANTECEDENTES

Debido a la situación mundial de pandemia por el COVID-19, he tenido la necesidad de adaptar mi trabajo de fin de máster a una revisión bibliográfica, ya que no pude concluir mis prácticas curriculares en Syngenta S. A. por la declaración del Estado de Alarma. Las tareas a realizar en dichas prácticas eran la recolección de datos y el fenotipado de plantas apoyando a varios proyectos de mejora genética de pimiento, lo que me motivó a llevar a cabo una investigación sobre cómo están controlados genéticamente distintos aspectos del fruto. Posteriormente, la empresa me dio la oportunidad de realizar seis meses más de prácticas extracurriculares, pudiendo así aumentar mis conocimientos en el sector y en el cultivo y la mejora genética del pimiento.

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
MEJORA GENÉTICA DE <i>CAPSICUM</i>: HISTORIA, METODOLOGÍA Y MARCADORES MOLECULARES	5
1. HISTORIA.....	5
2. METODOLOGÍA.....	5
3. MARCADORES MOLECULARES.....	10
MAPEO MOLECULAR E IDENTIFICACIÓN DE <i>QUANTITATIVE TRAIT LOCI</i> (QTLs) Y GENES ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO EN EL GENOMA DE <i>CAPSICUM</i>	17
1. <i>QUANTITATIVE TRAIT LOCI</i> (QTLs) ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO EN EL GENOMA DE <i>CAPSICUM</i>	17
a. Peso del fruto	20
b. Índice de forma del fruto.....	21
c. Diámetro o anchura del fruto.....	23
d. Longitud del fruto	24
e. Grosor o anchura del pericarpo	25
2. GENES ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO EN EL GENOMA DE <i>CAPSICUM</i>	26
3. APLICACIÓN PRÁCTICA.....	31
SELECCIÓN GENÓMICA (GS)	32
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

El género *Capsicum*, nativo de América Central y del Sur, forma parte de la gran familia *Solanaceae*. Hasta el momento, se han identificado 38 especies, de las que cinco (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, y *C. pubescens*) han sido domesticadas y extendidas con diferentes fines dependiendo de la región de cultivo. Dentro de las distintas especies hay gran diversidad en cuanto a características del fruto y de la planta, lo que hace que sea un cultivo muy versátil y asequible para numerosos usos, tanto alimentarios como medicinales, entre otros. La especie más importante en el mercado y en la que se centra el estudio es *C. annuum*. La mejora genética se basa en la variabilidad genética y el empleo de métodos de selección, cada vez más precisos, como son los marcadores moleculares. Gracias a estos, se han descubierto gran cantidad de QTLs asociados con diferentes características del fruto: peso (*fw2.1*, *fw3.2*), longitud (*fl3.1*), anchura o diámetro (*fd3.1*), índice de forma (*fs3.1*, *fs10.1*) y anchura o grosor de pericarpo (*pt3.1*). La colocación en los cromosomas 2 y 3 de varios loci indica un posible ligamiento, efectos pleiotrópicos o regiones involucradas en el desarrollo y la fisiología del fruto. Asimismo se han caracterizado algunos de los genes relacionados con los caracteres fenotípicos estudiados: *CaOVATE*, *CaKLUH*; además de otros genes candidato (*Longifolia 1*). Todos estos resultados muestran que la forma y el tamaño del fruto están controlados por patrones genéticos complejos.

ABSTRACT

The genus *Capsicum*, which is native to Central and South America, is part of the large *Solanaceae* family. To date, 38 species have been reported; five of these (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, and *C. pubescens*) have been domesticated and widespread with different purposes depending on the region of growing. There is a big diversity of plant and fruit traits among the diverse species that makes this crop very versatile and affordable for many uses, like medical and alimentary customs, among others. The most economically important specie, and on which this review in focused, is *C. annuum*. Breeding is based on genetic variability and more and more accurate selection methods, such as molecular markers. These have contributed to identify numerous QTLs associated with different fruit traits: fruit

weight (*fw2.1, fw3.2*), length (*fl3.1*), width or diameter (*fd3.1*), shape index (*fs3.1, fs10.1*) and pericarp thickness (*pt3.1*). The observed colocalization of many loci in the chromosomes 2 and 3 might be due to a linkage, pleiotropic effects or regions involved in the development and physiology of the fruit. Additionally, some of the fruit traits related genes have been characterized: *CaOVATE, CaKLUH*; and others are candidate genes (*Longifolia 1*). These results evince that fruit size and shape are controlled by complex genetic patterns.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* forma parte de la gran familia *Solanaceae*, formada por 90 géneros y 2500 especies, como tomate, berenjena o patata. Este género es nativo de América Central y del Sur, y su domesticación data de hace 6.000 años (Perry et al., 2007). Este cultivo fue introducido por primera vez en Europa por Cristóbal Colón durante sus viajes a América en el siglo XV y, posteriormente, expandido por África y Asia. Gracias a los intercambios comerciales que se llevaban a cabo en España y en Portugal, favorecido por su aclimatación en dichas regiones, el pimiento se dispersó por todo el mundo siendo usado como especia en aquella población que no podía permitirse la adquisición de canela, nuez moscada y otras especias que se empleaban como sazonzadoras o conservantes en la comida. (Tripodi y Kumar, 2019).

Hasta el momento, se han identificado 38 especies, de las que cinco (*C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, y *C. pubescens*) han sido domesticadas y extendidas con diferentes fines dependiendo de la región de cultivo (USDA-ARS, 2011). El pimiento es uno de los principales cultivos a nivel mundial, cuya producción se ha duplicado en los últimos 20 años (1998-2018, www.fao.org/faostat). En lo que se refiere a los tipos de pimiento seco, ha pasado de 2.3 a 4.1 millones de toneladas, y en los tipos frescos, de 18.5 a 36.8 millones de toneladas. El área de cultivo ha seguido la misma tendencia en los últimos 20 años, con un aumento de la superficie cultivada de aproximadamente el 20%.

El interés en el género *Capsicum* está en continuo crecimiento debido a la gran diversidad de muchas de sus características, como la arquitectura de la planta, la morfología de la flor, la tipología del fruto, los colores, la pungencia (picor), y características cualitativas que hacen que dicho cultivo sea extremadamente versátil y asequible para numerosos usos. Dentro del ámbito alimentario podemos distinguir tres usos: fresco; fresco procesado, por ejemplo, en salsas; y especias secas, como colorantes, saborizantes o conservantes (Poulos, 1994). El pimiento tiene excelentes propiedades desde el punto de vista nutricional ya que contiene altos niveles de ácido ascórbico (vitamina C) y altos contenidos en β -carotenos (pro-vitamina A) y en vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina y niacina); con un efecto biológico

antioxidante de protección en las células. (Padayatty et al., 2003; Howard and Wildman, 2007). Además, gracias a la presencia de diferentes compuestos como los que aportan pungencia, capsaicinoides, y los que otorgan color, carotenoides (capsantina y capsorubina en frutos rojos, violaxantina y neoxantina en amarillos, y luteína y β -carotenos en naranjas), dichos frutos también pueden emplearse en ámbitos no alimentarios: extractos o polvos de los frutos pungentes para usos etnobotánicos o medicina tradicional; extractos de capsaicinoides y carotenoides para medicina moderna o parafarmacia; extractos de capsaicinoides y ácidos orgánicos como insecticidas o repelentes y con efecto antibacteriano; usos espirituales de los frutos (ristras); uso ornamental de la planta completa; extractos de capsaicina a modo de defensa o castigo (Bosland and Votava, 1999; Kumar et al., 2006).



Figura 1: Ejemplos de tipos populares de pimientos picantes y dulces. (Tripodi and Kumar, 2019).

El genoma del pimiento (*Capsicum*) se estima que tiene aproximadamente 3.5 Gb. Dentro de este género se incluyen especies principalmente diploides, con 12 cromosomas ($n = 12$); sin embargo, hay especies con 13 cromosomas así como especies tetraploides, como es el caso de la especie silvestre *C. annum* var. *glabriusculum*. Desde el punto de vista filogenético, las distintas especies de *Capsicum* se han dividido en 11 clados en función de características morfológicas importantes, origen y relaciones filogenéticas (Carrizo et al., 2016). Las especies más importantes en mejora genética y en la economía se encuentran dentro de los tres clados principales: Annum, con tres especies domesticadas (*C. annum*, *C. frutescens* y *C. chinense*) y dos silvestres (*C. annum* var. *glabriusculum* y *C. galapagoense*); Baccatum con tres

variedades de *C. baccatum* (var. *baccatum*, var. *pendulum*, y var. *umbilicatum*) y las silvestres *C. chacoense* y *C. praetermissum*; y *Pubescens*, que solo incluye especies domesticadas. Entre todas estas especies la más destacada en el mercado mundial es *C. annuum*, domesticada a partir de la especie silvestre chile piquín o “Chiltepin” (*C. annuum* var. *glabriusculum*) (Eshbaugh, 1993), caracterizada por variedades tanto pungentes como no pungentes con un crecimiento herbáceo o de semiarbusto y gran diversidad de frutos en cuanto a tamaño, forma y color. Asimismo, la gran mayoría de estudios de mejora genética se centran en el clado *Annuum*, debido a la ausencia de barreras entre las especies que lo forman (Pickersgill, 1997).

Los programas de mejora genética de pimiento se orientan, a grandes rasgos, en cuatro direcciones: características agronómicas como es el rendimiento de cultivo, aspectos del fruto como color y forma, los hábitos de la planta y los set de fruto; resistencias frente a estreses abióticos, por ejemplo, salinidad y sequía, para ampliar las regiones aptas para cultivo; resistencias a estreses bióticos, bacterias, hongos y virus, que causan grandes pérdidas a nivel mundial; calidad, en cuanto a componentes bioactivos de interés como los mencionados anteriormente, vitaminas, capsaicinoides, carotenoides (Tripodi and Kumar, 2019). En este estudio nos centraremos en la mejora genética del pimiento (*C. annuum*) en aspectos cuantitativos del fruto como es el tamaño (longitud, anchura o diámetro, índice de forma), el peso y la anchura del pericarpo.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el análisis de los avances y logros obtenidos en la mejora genética del pimiento. Son objetivos concretos del mismo:

- La revisión de las metodologías de mejora empleadas en pimiento.
- La identificación de QTLs y genes asociados con diferentes características del fruto: peso, longitud, anchura o diámetro, índice de forma y anchura o grosor del pericarpio.

La consecución de estos objetivos permite tener una visión global de la situación actual de la mejora genética del pimiento, pudiendo emplear dichos resultados en futuros proyectos de mejora para la obtención de nuevas variedades de dicha planta.

MEJORA GENÉTICA DE *CAPSICUM*: HISTORIA, METODOLOGÍA Y MARCADORES MOLECULARES

1. HISTORIA

La domesticación del género *Capsicum* comenzó hace 6.000 años en América Central y del Sur. Los primeros estudios relacionados con la mejora genética del pimiento se centran en la herencia de características importantes para el rendimiento, la obtención de mutantes, las resistencias frente a enfermedades, la androesterilidad y diversos caracteres cualitativos (Deshpande, 1933; Daskalov, 1973; Shuh and Fontenot, 1990). Inicialmente, la mejora genética se conseguía mediante la selección de individuos con las características fenotípicas de interés, lo cual es un proceso muy lento y tedioso. Posteriormente, gracias a las aportaciones de la genética mendeliana, la mejora genética vegetal pasó de ser considerada un arte, a constituir una ciencia. Hoy en día, dicha ciencia cuenta con una amplia variedad de métodos de selección, pudiendo elegir en función de los objetivos del proyecto de mejora. A groso modo, la mejora genética del pimiento busca desarrollar en un único genotipo una variedad que tenga alto potencial en cuanto a productividad, resistencia a enfermedades y contenido en compuestos bioactivos (Srivastava and Mangal, 2019).

Debido al amplio espectro de pimientos con diferentes características, los objetivos de los proyectos de mejora de *Capsicum* varían en función del país de cultivo, las condiciones de cultivo, el uso final de dichos frutos así como el mercado al que va dirigido. Todo esto es tanto por economía de mercado como por las fitopatologías que afectan a las distintas variedades, que difieren de unas regiones a otras. Dentro de los tres campos de mejora que se llevan a cabo en *Capsicum*, el presente estudio se focaliza en el aumento de la productividad a través de determinadas características del fruto (anchura, longitud, peso y anchura del pericarpo).

2. METODOLOGÍA

Desde los inicios de la mejora genética vegetal, son muchos los métodos empleados, partiendo de métodos convencionales, más sistemáticos, hasta otros cada vez más precisos y rápidos. Como métodos convencionales podemos mencionar la

selección en masa, la selección de líneas puras, el método de pedigrí, el método de descendiente único o la mejora por retrocruzamiento (Srivastava and Mangal, 2019). La selección en masa es una de las primeras técnicas empleadas en *Capsicum* y de las más sencillas. Esta técnica nos permite mejorar simultáneamente múltiples características de herencia simple, con alta heredabilidad, que son fijadas fácilmente manteniendo cierta variabilidad. Sus principales usos son en mejora de variedades de pimiento locales y cultivares de polinización abierta (Srivastava and Mangal, 2019).

La selección de líneas puras (*pureline selection*) está basada en la selección de plantas, la cosecha separada y la evaluación de dichas selecciones al año siguiente para observar las características deseadas. La progenie que presenta un mejor desarrollo y poca variabilidad genética se cosecha en 'bulks' y se evalúa en referencia a los cultivares control. Finalmente, se obtienen líneas puras homocigotas de las mejores líneas. Se emplea en variedades locales de pimiento que son cultivadas por pequeños agricultores, así como en la obtención de variedades comerciales de pimientos tipo chili (Srivastava and Mangal, 2019).

El método de pedigrí consiste en la mejora genética mediante una selección entre y dentro de las familias, de manera que se les otorga un número de pedigrí a los individuos seleccionados permitiendo una trazabilidad total hasta la planta original, seleccionada en la generación F₂ (Srivastava and Mangal, 2019).. Este método se emplea en programas de mejora combinado con retrocruzamiento para la introgresión de genes de interés (Alballat et al., 2019).

El método de descendiente único (*single-seed descent*) consiste en la recolección de una semilla de un solo fruto de cada planta de la población segregante sin selección. Este método se emplea en proyectos de mejora genética llevados a cabo en invernadero para poder obtener varias generaciones en un mismo año, para generar gran cantidad de líneas para cruces en el desarrollo de híbridos y para crear poblaciones de líneas recombinantes empleadas en los estudios de mapeo (Srivastava and Mangal, 2019).

La mejora por retrocruzamiento (*backcrossing*) se emplea para transferir uno o unos pocos genes de variedades silvestres o primitivas a variedades élite comerciales.

En muchas ocasiones se combina la segunda generación de retrocruzamiento (BC_2) con el método de pedigrí. En la actualidad es uno de los métodos más empleado en los programas de mejora genética de pimiento (Srivastava and Mangal, 2019).

Otro de los métodos más usados actualmente es la mejora basada en heterosis (*heterosis breeding*). Dicho concepto podría definirse como el aumento significativo de un carácter cuantitativo por encima de los niveles obtenidos en las líneas puras, cuando se genera el heterocigoto (híbrido) mediante el cruce de dichas líneas puras. La obtención de híbridos F_1 en *Capsicum* está creciendo a gran escala por parte de las empresas privadas (Sharma et al., 2020).

A medida que dicha ciencia se ha ido desarrollando han ido surgiendo nuevos métodos para la mejora genética vegetal y, en concreto, para la mejora del pimiento. Entre estos nos encontramos con la mejora por mutación, la poliploidía, el desarrollo de haploides, los transgénicos y la selección asistida por marcadores moleculares (Srivastava and Mangal, 2019).

Uno de los grandes problemas del desarrollo de nuevas variedades de pimiento, y de cualquier vegetal, es el tiempo requerido para encontrar en la naturaleza especies que, mediante la evolución únicamente, tengan las características deseadas para poder emplearlas en programas de mejora genética. Para solucionar esta limitación se utiliza la mutagénesis y, con ella, la mejora por mutación. Este método consiste en la generación de nueva variabilidad genética mediante mutágenos químicos o físicos, para, posteriormente, emplearla en el desarrollo de nuevas variedades (Srivastava and Mangal, 2019). En el caso de *Capsicum*, la parte mutagenizada es la semilla, ya que es la que mejores resultados ha dado, aunque también se usa la mutagénesis en los granos de polen empleados en polinización (Daskalov, 1986). A parte de su uso en la generación de variabilidad genética, también tiene un gran campo de aplicación en la anotación genética y el estudio de genes.

La mejora por poliploidía se basa en eventos de multiplicación de la dotación genética, que se asocian con un aumento en el vigor, seguidos de la adaptación de dichas poblaciones poliploides a las condiciones de cultivo. Este incremento observado en los individuos poliploides respecto a sus relativos diploides se ha asociado al

fenómeno de segregación transgresiva o formación de fenotipos extremos. En el caso de pimiento es fácil aumentar o reducir los niveles de ploidía de forma artificial. Esto se puede realizar mediante el tratamiento de las axilas de las hojas heridas con colchicina (Srivastava and Mangal, 2019). Sin embargo, en dicho cultivo se ha visto que la poliploidía no aporta ventajas en caracteres agronómicos respecto a los diploides. Por ejemplo, Takizawa et al. (2008) observaron que los tetraploides producían frutos más pequeños y de menor peso que los diploides, sin variaciones en la carga de frutos.

En contraposición con la poliploidía tenemos la mejora por haploidía (*haploid breeding*). A través de varios experimentos de inducción de haploidía mediante androgénesis, se ha concluido que la respuesta androgénica depende de diversos factores: condiciones de crecimiento de la planta, edad, genotipo de la planta (Ercan et al. 2006; Niklas-Nowak et al. 2012; Koleva-Gudeva et al. 2013; Alremi et al. 2014), etapa de desarrollo de las microesporas de la antera (Nowaczyk and Kisiata 2006; Parra-Vega et al. 2013), composición del medio de cultivo de las células, concentración y combinación de los reguladores de crecimiento, aditivos orgánicos e inorgánicos (Büyükalaca et al. 2004; Zhao et al. 2010; Taşkin et al. 2011; Olszewska et al. 2014) y el pretratamiento de las yemas de las flores y/o de las anteras (Koleva-Gudeva 2007; Özkum and Tırdamaz 2007; Nowaczyk et al. 2015). A pesar de que la tecnología de desarrollo de doble haploides es una técnica muy rápida para obtener homocigosidad completa, en el caso de *Capsicum* es necesario mejorar la técnica debido a la naturaleza recalcitrante del pimiento (Sharma et al., 2020).

Un cuello de botella importante en la mejora genética del pimiento es la barrera que existe entre diferentes especies en la hibridación post-cigoto, que dificulta los cruces necesarios para el desarrollo de variedades. Con el fin de sortear dichas barreras se emplea la técnica de rescate de embriones. La escisión del embrión y el cultivo in vitro es un proceso complejo. Además, el momento en el que se produce el aborto del embrión tras la hibridación varía en función de los genotipos implicados en el cruce. En el caso del pimiento, se ha conseguido rescatar embriones interespecíficos en las últimas etapas inmaduras (Yoon et al., 2006) así como en etapas más tempranas (Manzur et al., 2015). Debido a la dificultad del proceso se ha desarrollado la metodología de puente genético, basada en el uso de una especie que sea

filogenéticamente cercana a las dos especies del cruce de interés. Esta especie filogenéticamente cercana, llamada especie puente, se cruza, en primer lugar, con una de las especies implicadas en el cruce de interés y se obtiene un híbrido; posteriormente, este híbrido se cruza con la otra especie implicada en el cruce (Shivanna and Bahadur, 2015). Por ejemplo, *C. chinense* ha demostrado ser una especie puente ideal para conseguir con éxito la hibridación de *C. annuum* y *C. baccatum* (Manzur et al., 2015).

Una técnica alternativa a todas las anteriores es la transformación genética del pimiento. La gran ventaja del desarrollo de transgénicos es la ausencia de barreras entre especies o entre géneros que se da en los cruces realizados para la obtención de híbridos. Esta tecnología permite transferir genes o caracteres de interés en el género *Capsicum*. Los primeros trabajos de transformación en pimiento fueron publicados en 1990 (Liu et al., 1990). Las metodologías más desarrolladas para pimiento son mediante *Agrobacterium*, usando los cotiledones y/o los hipocotilos como explantes (Lee et al., 2004; Shin et al., 2002); o la transformación directa usando bombardeo de partículas o *gene gun* (Chee et al., 2018). A pesar de que es una técnica prometedora, los protocolos experimentados en pimiento han demostrado baja reproductibilidad por lo que esto limita los estudios en los que se emplea dicha técnica (Srivastava and Mangal, 2019). La mayor parte de experimentos se han llevado a cabo para intentar introducir resistencias a agentes biológicos como virus (Lee et al., 2004; Shin et al., 2002).

Partiendo de las bases de las técnicas convencionales anteriormente mencionadas, y con el gran desarrollo de la genética molecular, se ha producido un antes y un después en la mejora genética, yendo de una mejora tradicional a una mejora moderna. La principal diferencia entre estas es la distinción entre fenotipo y genotipo. Mientras que los genes son heredados, el fenotipo es la expresión de dichos genes influenciada por el ambiente. De este modo, la variación genética se produce a nivel de DNA y el screening y la selección de los genotipos de interés se realiza en el fenotipo. Esto se traduce en que los métodos convencionales de selección conllevan una serie de inconvenientes por dar importancia únicamente al fenotipo (selección directa). El primero de ellos es que las nuevas variedades seleccionadas contienen, a

parte de los caracteres de interés, una serie de características que han pasado desapercibidas durante el proceso de selección pero que han ido transfiriéndose y resultan ser indeseadas en las nuevas variedades. Un segundo inconveniente es la transferencia de la diversidad genética entre especies sexualmente incompatibles, teniendo que realizar un amplio número de introgresiones y retrocruzamientos, en los cuales entra en juego de nuevo el primer inconveniente. El último problema que presenta la mejora tradicional es la incapacidad de controlar la expresión y/o localización de los genes transferidos en el nuevo fondo genético. Todo esto no quiere decir que la mejora tradicional no pueda continuar desarrollando nuevas variedades, sino que las metodologías empleadas, por sí solas, no pueden aprovechar el potencial genético de un genotipo. Esto se consigue gracias a la aplicación conjunta con la mejora moderna, o mejora molecular, que aporta precisión, rapidez y reducción de costes (Srivastava and Mangal, 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, la mejora genética convencional se basa en la selección directa, centrándose en los valores fenotípicos de los distintos caracteres estudiados. Esto resulta efectivo en caracteres cualitativos mientras que para caracteres cuantitativos hay una gran influencia del ambiente. Ante esta limitación, la mejora genética moderna presenta la selección indirecta, efectiva en caracteres poligénicos o genéticamente complejos. Esta consiste en la selección de caracteres o fragmentos de DNA que sean fácilmente medibles o detectables y que estén estrechamente ligados a los caracteres o genes de interés que son más complicados de medir o están afectados por el ambiente. En este sentido se desarrollaron los marcadores moleculares (DNA) como una herramienta práctica e idónea para la selección genética en la mejora vegetal (Srivastava and Mangal, 2019).

3. MARCADORES MOLECULARES

La mejora asistida por marcadores moleculares (MAB), es, actualmente, la metodología más usada en la mejora genética de pimiento. Al emplear un método de selección indirecta no nos permite seleccionar realmente los genes de interés, sin embargo, ha demostrado ser la mejor herramienta de selección a nivel de DNA. La selección asistida por marcadores moleculares (MAS) presenta numerosas ventajas

frente a la selección fenotípica convencional, siendo la primera más simple, pudiéndose realizar en cualquier etapa del desarrollo de la planta y permitiendo seleccionar la planta con alta fiabilidad. Además, reduce el tiempo invertido en los procesos de mejora genética. Por todo esto, los marcadores moleculares tienen numerosas aplicaciones como son la construcción de mapas genéticos, el análisis de mapeo comparativo, las relaciones entre germoplasmas, la propia localización de los genes, el estudio de la función de los mismos, así como el estudio de diversidad genética, parámetros de calidad, y la propia mejora genética vegetal (Lee, 2019).

Los marcadores moleculares o marcadores de DNA se pueden dividir en dos categorías, según Kumar (1999), en función de si la detección de los polimorfismos se realiza mediante hibridaciones o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre los primeros los más destacados son los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) que se suelen detectar mediante sondas o mediante Southern blot. Dentro de los marcadores moleculares basados en la PCR tenemos: la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD), las repeticiones entre las secuencias simples (ISSR), los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), las repeticiones de secuencias simples (SSR o microsatélites), las secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (CAPS), las regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR), los polimorfismos de amplificación de regiones diana (TRAP) y los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs). Fuera de la anterior clasificación nos encontramos con otros marcadores como son los polimorfismos de conformación de cadena única (SSCP) (Riaz et al., 2020).

Para analizar los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLPs, en primer lugar, se extrae el DNA en estudio, posteriormente, se fragmenta con enzimas de restricción, se separan dichos fragmentos en un gel de electroforesis y, por último, se procede a realizar la hibridación del DNA (Southern blot) y su revelado con sondas marcadas, como pueden ser clones aleatorios de DNA genómico o cDNA. Esto permiten identificar fragmentos hibridados de diferentes longitudes resultado de la presencia o la ausencia de sitios de restricción específicos de las enzimas utilizadas, así como de la inserción o delección de secuencias de DNA en dichos fragmentos. Estos marcadores presentan alta reproducibilidad, herencia codominante y una buena

capacidad de transferencia (Lee, 2019; Riaz et al., 2020). Se emplean para la construcción de mapas genéticos de *Capsicum* (Prince et al., 1993) y para la detección de QTLs (Rao et al., 2003; Chaim et al., 2001; Chaim et al., 2003a; Chaim et al., 2003b; Zygier et al., 2005; Borovsky and Paran, 2011).

Los marcadores basados en la PCR emplean cebadores que pueden ser aleatorios (RAPD, ISSR y AFLP) o específicos de secuencia (SSR, CAPS, SCAR, SNP) (Lee, 2019). Como su propio nombre indica, los RAPDs (amplificación aleatoria de DNA polimórfico) emplean cebadores aleatorios que suelen ser de 10 pares de bases (bp). Se comienza con la amplificación de todo el DNA genómico con uno de estos cebadores, seguida de la separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los polimorfismos entre las diferentes muestras se detectan en función de la presencia o la ausencia de bandas, siendo dichos marcadores de herencia dominante (Lee, 2019; Riaz et al., 2020). Junto con los RFLPs, permiten la construcción de mapas de ligamiento de pimiento (Lefebvre et al., 1995); se emplean también en la detección de QTLs (Chaim et al., 2001; Dwivedi et al., 2015; Moulin et al., 2015).

Los marcadores tipo ISSR (repeticiones entre las secuencias simples) emplean como cebadores los microsatélites, amplificando secuencias de DNA que se encuentran entre dos regiones idénticas de repeticiones de microsatélites. Los ISSRs presentan una reproducibilidad más alta que los RAPDs debido a que los cebadores empleados son más largos, 16-25 bp (Reddy et al., 2002); siendo también de herencia dominante (Lee, 2019). La mayor aplicación de estos marcadores en *Capsicum* se encuentra, junto con los SSR, en los estudios de relaciones filogenéticas o el análisis de la variabilidad genética (Moulin et al., 2015).

El análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados o AFLPs es similar al que se lleva a cabo en los RFLPs, aunque algo más complejo. Se comienza igualmente con la extracción del DNA en estudio, se realiza la digestión con dos enzimas de restricción y, en este caso, los fragmentos obtenidos se ligan a adaptadores. Posteriormente, se realiza una amplificación preselectiva seguida de una amplificación selectiva y finalmente, se procede a la separación mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y a la revelación en tinción de plata. El perfil

de bandas obtenido informa de las diferencias en los sitios de restricción (Blears et al., 1998). Los estudios en los que se emplean los AFLPs en pimiento se centran en la construcción de mapas de ligamiento (Kang et al., 2001) y en la identificación de QTLs asociados con resistencias a enfermedades (Kim et al., 2010) o con características de fruto (Chaim et al., 2001; Borovsky and Paran, 2011; Kargbo and Wang, 2010).

Los microsatélites o SSR son el grupo de secuencias simples repetitivas de DNA más pequeñas, con una longitud de 1-6 bp. En este caso se emplean cebadores específicos que flanquean las regiones de los microsatélites para poder amplificarlo por PCR. Estos marcadores se pueden diseñar a partir de DNA genómico o génico de los microsatélites. Tienen herencia codominante (Kesawat and Das, 2009). Presentan unos usos similares al resto de marcadores, tanto para mapas genéticos (Mimura et al., 2012), como para el mapeo de QTLs (Arjun et al., 2018; Dwivedi et al., 2015; Naegele et al., 2016; Moulin et al., 2015; Chakrabarti et al., 2013) o el análisis de la diversidad (Rivera et al., 2016). Son los más empleados en *Capsicum* debido a que gran cantidad están disponibles en el dominio público, son simples y realmente efectivos.

El desarrollo de las secuencias polimórficas amplificadas y cortadas o CAPSs se lleva a cabo mediante PCR. Se amplifican las secuencias deseadas con cebadores específicos (20-25 bp), se digieren con una o varias enzimas de restricción y se separan dichos fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa, uni o bidimensional. Al igual que los marcadores RFLPs y AFLPs, las bandas obtenidas indican la presencia o ausencia de sitios de restricción; sin embargo, los CAPSs presentan las ventajas de que la cantidad de muestra que se necesita para la PCR es mínima, en comparación con los RFLPs; son codominantes, a diferencia de los RADPs; presentan alta reproducibilidad; y su procedimiento es más simple que el de los RFLPs. Se emplean en el mapeo de genes (Lee et al., 2008) y de QTLs (Borovsky and Paran, 2011).

Los marcadores tipo SCARs o regiones amplificadas caracterizadas por secuencia, se identifican por PCR con cebadores específicos. Estos pueden ser dominantes o codominantes, dependiendo del patrón de herencia. El perfil de bandas de los primeros indica la presencia o la ausencia de amplificación; mientras que el de los codominantes informará de la longitud de los polimorfismos debida a inserciones o

deleciones. Estos marcadores presentan mayor reproductibilidad que los RAPDs debido a que los cebadores empleados son de mayor longitud (22-24 bp) y son específicos (Kesawat and Das, 2009). El desarrollo de dichos marcadores permite identificar QTLs o genes asociados a ellos (Dwivedi et al., 2015).

Los polimorfismos de amplificación de regiones diana o TRAP se tratan de marcadores rápidos y efectivos que se emplean en herramientas bioinformáticas y bases de datos de marcadores de secuencias expresadas (ESTs) para producir marcadores cercanos a secuencias de genes candidatos (Riaz et al., 2020).

Los marcadores moleculares más novedosos y prometedores son los polimorfismos de un único nucleótido o SNPs, que están repartidos por todo el genoma. Estos nos permiten diferenciar entre dos secuencias de DNA o individuos, al presentar herencia codominante (Wang et al., 1998). El descubrimiento de estos marcadores conllevó el desarrollo de numerosas técnicas de genotipado para su identificación, basadas en la combinación de una técnica de preparación de la muestra (hibridación alelo-específica, extensión con cebadores, ligación con oligonucleótidos o rotura por nucleasa) con una técnica de análisis (separación en gel, array, espectrometría de masas y lectores de placas) (Gut, 2001). Algunas de las técnicas establecidas son el ensayo Taq-Man (Livak, 1999) o el análisis de melting de alta resolución (HRM) (Liew et al., 2004). El primero se basa en la distinción entre alelos debido a una sustitución en un solo nucleótido usando sondas marcadas con fluorocromos (oligonucleótidos marcados con, bien un fluorocromo reportero, FAM o TET, bien un fluorocromo quencher) (Livak, 1999). El análisis HRM permite detectar polimorfismos en DNA de doble cadena mediante la comparación de las curvas de melting, pudiendo usarse en genotipado de SNPs, SSRs e inserciones y deleciones (Liew et al., 2004). Esta última es más rápida, más barata y más simple que la anterior. Entre las aplicaciones de los SNPs en mejora genética de pimiento están los mapas genéticos (Pereira-Dias et al., 2019), los mapas de ligamiento (Lee et al., 2016; Wei et al., 2020; Hulse-Kemp et al., 2016), la identificación de variedades (Jung et al., 2010) o el mapeo de QTLs (Han et al., 2016; Lu et al., 2012; Lee et al., 2020; Chunthawodtiporn et al., 2018; Du et al., 2019; Colonna et al., 2019; Wu et al., 2019; Nimmakayala et al., 2016; Naegele et al., 2014).

Otro tipo de marcadores moleculares son los polimorfismos de conformación de cadena simple o SSCPs. Se trata de marcadores simples y eficientes que dependen del cambio en la movilidad de la cadena simple de DNA en un gel de poliacrilamida no desnaturizante (Dong and Zhu, 2005).

Tabla 1: Características de los marcadores moleculares (Lee, 2019).

Marcador	Abundancia genómica	Especificidad de locus	Codominancia	Reproducibilidad	Cantidad de DNA requerida	Coste del análisis
RFLP	A	S	S	A	A	A
RAPD	A	N	N	B	B	B
ISSR	M/A	N	N	M/A	L	L
AFLP	A	N	N/S	M/A	M	M
SSR	A	S	S	A	B	B
CAPS	B	S	S	A	B	B
SCAR	B	S	N/S	A	B	B
SNP	MA	S	S	A	B	B/MB

MA: Muy alto; A: Alto; M: Medio; B: Bajo; MB: Muy bajo; S: Sí; N: No.

En el caso de la familia *Solanaceae*, son ampliamente utilizados una serie de marcadores llamados marcadores COS (Conserved Ortholog Set), destacando en pimiento el grupo COSII. Estos marcadores están basados en la PCR y se desarrollan a partir de genes ortólogos conservados de copia única provenientes de *Arabidopsis* (Fulton et al., 2002). Con ayuda de estos marcadores se ha desarrollado uno de los mapas moleculares de pimiento más importantes (Wu et al., 2009). Se emplean también en la identificación de QTLs (Borovsky and Paran, 2011; Yarnes et al., 2013; Rinaldi et al., 2016).

Gracias a miles de años de selección humana de las plantas de pimiento en diferentes ambientes y con diferentes fines, actualmente hay una gran diversidad de variedades. Podemos denominar como síndrome de domesticación a las características deseadas que han sido, o son, seleccionadas por los mejoradores (Gepts, 2014). Entre ellas tenemos: frutos persistentes, se mantienen en la planta hasta la cosecha; frutos colgantes, asociado con un aumento de tamaño, mejor protección frente a la exposición solar y restricción a su consumo por los pájaros; apariencia del fruto y variación en el grado de pungencia, asociado con el mercado objetivo (Kumar et al., 2018). Sin embargo, debido a las migraciones de las variedades de unos lugares a otros y a las selecciones artificiales de estas, la mejora genética tiene un gran inconveniente: la terrible reducción de las bases genéticas del pimiento y de la variabilidad genética,

como ocurre en la mayoría de las especies cultivadas. Durante el siglo pasado esta pérdida se vio acelerada por el gran desarrollo de variedades comerciales e híbridos de alto rendimiento, los cuales son genéticamente homogéneos (Votava et al., 2005). A estos hechos hay que sumarles el cambio climático y la creciente demanda de alimentos mundial, lo que hace que sea necesaria la recuperación de la variabilidad genética. En este sentido, las variedades locales, mantenidas por los agricultores y bien adaptadas a los ambientes en los que llevan muchos años cultivándose, son buenas candidatas para recuperar la diversidad genética perdida. Por todos estos motivos, la mejora genética actual involucra gran cantidad de especies locales o nativas, cuya caracterización del germoplasma está asistida por marcadores moleculares (Rivera et al., 2016).

La mejora genética asistida por marcadores moleculares es una combinación de la aplicación de los marcadores moleculares junto con los mapas de ligamiento y la genómica, para lograr una alteración o mejora en las características de interés mediante ensayos genotípicos (Sharma et al., 2020). Dentro de este campo se han desarrollado distintas estrategias de mejora como la selección asistida por marcadores mencionada anteriormente (MAS), el retrocruzamiento asistido por marcadores (MABC), la selección recurrente mediante marcadores (MARS) y la selección de genoma completo (genome-wide selection, GWS) o selección genómica (GS) (Herzog and Frisch, 2011).

MAPEO MOLECULAR E IDENTIFICACIÓN DE *QUANTITATIVE TRAIT LOCI* (QTLs) Y GENES ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO EN EL GENOMA DE *CAPSICUM*

Los mapas genéticos y los mapas de ligamiento empleados en mejora genética vegetal requieren el conocimiento de las secuencias genómicas completas pertenecientes a las especies en estudio. En el caso de *C. annuum* hay dos genomas de referencia publicados, que incluyen una especie nativa de México, Criollo de Morelos (CM334) (Kim et al., 2014), y una especie cultivada, denominada Zunla-1 (Qin et al., 2014). Además, se ha conseguido secuenciar el genoma de un híbrido F₁ obtenido a partir de un cruce interespecífico entre CM334 y una línea de mejora de pimiento *blocky* no pungente (Hulse-Kemp et al., 2018). Gracias a estos se han desarrollado gran cantidad de mapas de alta densidad para el mapeo en pimiento, como es, por ejemplo, el mapa de ultra alta densidad construido por Han et al. (2016) en una población de líneas endogámicas recombinantes (RIL) del cruce entre la variedad Prenal y la variedad Dempsey. Dado que los mapas están basados en marcadores moleculares permiten realizar a su vez estudios de sintenia entre las distintas especies de *Solanaceae* o estudios comparativos de mapeo de características comunes (Mohan and Paran, 2019). Un ejemplo de su uso en estudios comparativos entre especies es el realizado por Lee et al. (2016), en el que se comparó el mapa genético de *C. baccatum* con el de *C. annuum* (CM334) y se descubrió la posible causa de las barreras genéticas entre dichas especies: diferentes translocaciones entre los cromosomas 1 y 8; 3 y 5; y 3 y 9.

1. *QUANTITATIVE TRAIT LOCI* (QTLs) ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO EN EL GENOMA DE *CAPSICUM*

El desarrollo de los mapas genéticos ha permitido grandes avances en los programas de mejora genética, pudiendo mapear caracteres cuantitativos, poligénicos o de herencia compleja, conocidos como loci de caracteres cuantitativos (QTLs). Dichos QTLs son regiones del genoma responsables de la variación de caracteres cuantitativos, y su estudio permite a los mejoradores genéticos la identificación y el mapeo de los loci asociados a características de interés agronómico (Moulin et al, 2015). El poder de detección de los QTLs viene determinado por diversos parámetros

entre los que se incluyen la elección de las líneas parentales, cuanto más diferentes genéticamente sean ambas líneas, más fácil será la detección de los QTLs; el tamaño de la población de estudio; y el diseño de los ensayos, que afecta a la heredabilidad (Crepieux et al., 2004). Además, hay que tener en cuenta que dichos QTLs se ven afectados por las condiciones ambientales, pudiendo encontrar diferencias entre los QTLs detectados en distintos ensayos.

Las características relacionadas con el fruto en pimiento son determinantes críticos en relación a la calidad adecuada para el mercado, tanto para adaptarla a los gustos de los consumidores como para el procesado o la calidad post-cosecha (Hong, 2020). El presente estudio se centra en la revisión de QTLs asociados a características esenciales del fruto como son la longitud, la anchura, el índice de forma (relación entre la longitud y la anchura), el peso del fruto y la anchura o grosor del pericarpo. Estas características muestran valores de heredabilidad en el sentido amplio altos, lo que quiere decir que son los factores genéticos los principales determinantes de la variabilidad fenotípica observada (Lee et al., 2020). La forma del fruto y la anchura del pericarpo son dos de las características más importantes para decidir el éxito de una variedad de cultivo en una región determinada (Naegele et al., 2016). Los primeros estudios de la forma del fruto en pimiento, realizados por Sinnott y Kaiser (1934) y por Kaiser (1935), demostraron que la forma del fruto (relación entre la longitud y la anchura) en *C. annuum* está genéticamente controlada por sí sola y no como el resultado de dimensiones de anchura y longitud heredadas de forma independiente. Además, el control genético de la forma del fruto varía según el cruce realizado, pudiendo observarse una herencia monogénica en algunos casos o una segregación más compleja en otros (Chaim et al., 2003a).

Hay numerosos QTLs asociados con el peso del fruto, la forma, la longitud, la anchura y el grosor del pericarpo (Tabla 2). Las poblaciones de mapeo incluyen cruces entre diferentes variedades de la especie en estudio, *C. annuum*, así como de esta con otras especies del mismo género, como son *C. frutescens*, *C. galapagoense*, *C. baccatum* y *C. chinense*.

Tabla 2: Lista de QTLs asociados a características del fruto de pimiento (Nº: Número).

Característica	Población	Nº de QTLs	QTL de efecto principal	Tipo de marcador	Referencia
Peso del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x Prennial (<i>C. annuum</i>)	5	<i>fw3.2</i>	RFLP, AFLP, RAPD	Chaim et al. (2001)
Peso del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x BG2816 (<i>C. frutescens</i>)	5	<i>fw2.1</i>	RFLP	Rao et al. (2003)
Peso del fruto	PI 152225 (<i>C. chinense</i>) x 100/63 (<i>C. annuum</i>)	3	<i>fw2.1</i>	RFLP	Zygier et al. (2005)
Peso del fruto	Yolo wonder (YW) (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	4	<i>Lfw4.1</i>		Barchi et al. (2009)
Peso del fruto	YCM334 (<i>C. annuum</i>) x Taean (<i>C. annuum</i>)	3	<i>qMFW4.1</i>	SNP	Lu et al. (2012)
Peso del fruto	PEN45 (<i>C. baccatum</i>) x SM, GNM (<i>C. annuum</i>)	3	<i>LG1_8</i>	SNP	Eggink et al. (2014)
Peso del fruto	Prennial (<i>C. annuum</i>) x Dempsey (<i>C. annuum</i>)	6		SNP	Han et al. (2016)
Peso del fruto	007EA (<i>C. annuum</i>) x P1512 (<i>C. frutescens</i>)	1	<i>qFW11</i>	SNP	Wei et al. (2020)
Peso del fruto	Prennial (<i>C. annuum</i>) x Dempsey (<i>C. annuum</i>)	3	<i>PD_FWg7.1</i>	SNP	Lee et al. (2020)
Índice de forma del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x Prennial (<i>C. annuum</i>)	3	<i>fs3.1</i>	RFLP, AFLP, RAPD	Chaim et al. (2001)
Índice de forma del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x Prennial (<i>C. annuum</i>)		<i>fs3.1</i>	RFLP	Chaim et al. (2003a)
Índice de forma del fruto	5226 (<i>C. annuum</i>) x PI159234 (<i>C. chinense</i>)	2	<i>fs3.1, fs10.1</i>	RFLP	Chaim et al. (2003b)
Índice de forma del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x BG2816 (<i>C. frutescens</i>)	2	<i>fs3.1</i>	RFLP	Rao et al. (2003)
Índice de forma del fruto	PI 152225 (<i>C. chinense</i>) x 100/63 (<i>C. annuum</i>)	3	<i>fs4.2</i>	RFLP	Zygier et al. (2005)
Índice de forma del fruto	Yolo wonder (YW) (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	6	<i>Frs3.1</i>		Barchi et al. (2009)
Índice de forma del fruto	5226 (<i>C. annuum</i>) x PI159234 (<i>C. chinense</i>)	2	<i>fs3.1, fs10.1</i>	AFLP, RFLP, COSII, CAPS	Borovsky and Paran (2011)
Índice de forma del fruto	LS2341 (<i>C. annuum</i>) x Calofornia Wonder (CW) (<i>C. annuum</i>)	2		SSR, AFLP, CAPS, ETS	Mimura et al. (2012)
Índice de forma del fruto	PEN45 (<i>C. baccatum</i>) x SM, GNM (<i>C. annuum</i>)	5	<i>LG1_8</i>	SNP	Eggink et al. (2014)
Índice de forma del fruto	Early Jalapeno (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	5	<i>4.1</i>	SNP	Naegele et al. (2014)
Índice de forma del fruto	Prennial (<i>C. annuum</i>) x Dempsey (<i>C. annuum</i>)	4	<i>FS.3.1, FS3.2</i>	SNP	Han et al. (2016)
Diámetro del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x Prennial (<i>C. annuum</i>)	4	<i>fd3.1</i>	RFLP, AFLP, RAPD	Chaim et al. (2001)
Diámetro del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x BG2816 (<i>C. frutescens</i>)	6	<i>fd2.1, fd3.1</i>	RFLP	Rao et al. (2003)
Diámetro del fruto	Yolo wonder (YW) (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	7	<i>Frd11.1</i>		Barchi et al. (2009)
Diámetro del fruto	LS2341 (<i>C. annuum</i>) x Calofornia Wonder (CW) (<i>C. annuum</i>)	4		SSR, AFLP, CAPS, ETS	Mimura et al. (2012)
Anchura del fruto	YCM334 (<i>C. annuum</i>) x Taean (<i>C. annuum</i>)	3	<i>qFWd1</i>	SNP	Lu et al. (2012)
Anchura máxima del fruto	2816-6 (<i>C. frutescens</i>) x NuMexRNAKY (<i>C. annuum</i>)	13		COSII	Yarnes et al. (2013)
Anchura del fruto	PEN45 (<i>C. baccatum</i>) x SM, GNM (<i>C. annuum</i>)	7	<i>LG1_8, LG9</i>	SNP	Eggink et al. (2014)

Tabla 2: (Continuación)

Característica	Población	Nº de QTLs	QTL de efecto principal	Tipo de marcador	Referencia
Anchura del fruto	CW (<i>C. annuum</i>) x LCA235 (<i>C. annuum</i>)	1	<i>Qfw.iivr2.1</i>	SSR, SCAR, RAPD	Dwivedi et al. (2015)
Diámetro del fruto	Prennial (<i>C. annuum</i>) x Dempsey (<i>C. annuum</i>)	5	<i>FD.1, FD3.2</i>	SNP	Han et al. (2016)
Longitud del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x Prennial (<i>C. annuum</i>)	4	<i>fl3.1</i>	RFLP, AFLP, RAPD	Chaim et al. (2001)
Longitud del fruto	Maor (<i>C. annuum</i>) x BG2816 (<i>C. frutescens</i>)	4	<i>fl2.1</i>	RFLP	Rao et al. (2003)
Longitud del fruto	Yolo wonder (YW) (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	3	<i>Frl4.1</i>		Barchi et al. (2009)
Longitud del fruto	LS2341 (<i>C. annuum</i>) x Calofornia Wonder (CW) (<i>C. annuum</i>)	2		SSR, AFLP, CAPS, ETS	Mimura et al. (2012)
Longitud del fruto	YCM334 (<i>C. annuum</i>) x Taean (<i>C. annuum</i>)	3	<i>qFL4.1</i>	SNP	Lu et al. (2012)
Longitud máxima del fruto	2816-6 (<i>C. frutescens</i>) x NuMexRNAKY (<i>C. annuum</i>)	15		COSII	Yarnes et al. (2013)
Longitud del fruto	PEN45 (<i>C. baccatum</i>) x SM, GNM (<i>C. annuum</i>)	4	<i>LG10.1</i>	SNP	Eggink et al. (2014)
Longitud del fruto	CW (<i>C. annuum</i>) x LCA235 (<i>C. annuum</i>)	2	<i>Qfl.iivr3.2</i>	SSR, SCAR, RAPD	Dwivedi et al. (2015)
Longitud del fruto	Prennial (<i>C. annuum</i>) x Dempsey (<i>C. annuum</i>)	6	<i>FL3.1, FL3.2, FL3.3</i>	SNP	Han et al. (2016)
Longitud del fruto	FL201 (<i>C. annuum</i>) x TC07245 (<i>C. galapagoense</i>)	2	<i>pauf1.2.1</i>	SSR	Arjun et al. (2017)
Longitud del fruto	007EA (<i>C. annuum</i>) x P1512 (<i>C. frutescens</i>)	1	<i>qFL3</i>	SNP	Wei et al. (2020)
Grosor del pericarpo	Maor (<i>C. annuum</i>) x Prennial (<i>C. annuum</i>)	4	<i>pt3.1</i>	RFLP, AFLP, RAPD	Chaim et al. (2001)
Grosor del pericarpo	Maor (<i>C. annuum</i>) x BG2816 (<i>C. frutescens</i>)	2	<i>perwd3.2, perwd11.1</i>	RFLP	Rao et al. (2003)
Grosor del pericarpo	Yolo wonder (YW) (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	5	<i>Pet10.1</i>		Barchi et al. (2009)
Grosor del pericarpo	2816-6 (<i>C. frutescens</i>) x NuMexRNAKY (<i>C. annuum</i>)	9		COSII	Yarnes et al. (2013)
Grosor del pericarpo	Early Jalapeno (<i>C. annuum</i>) x CM334 (<i>C. annuum</i>)	1	<i>4.1</i>	SNP	Naegele et al. (2014)
Gorsor del pericarpo	CW (<i>C. annuum</i>) x LCA235 (<i>C. annuum</i>)	2	<i>Qpt.iivr2.1</i>	SSR, SCAR, RAPD	Dwivedi et al. (2015)

a. Peso del fruto

Se han identificado QTLs asociados con el peso del fruto en varios cromosomas. Chaim et al. (2001) descubrieron 5 regiones ligadas a dicha característica, entre las que *fw3.2*, localizado en el grupo de ligamiento o cromosoma 3, tiene el mayor efecto en el fenotipo (15-18%). En el estudio realizado por Rao et al. (2003) la región asociada con el peso del fruto que mayor porcentaje de variabilidad explica es *fw2.1* (16-20%), localizada en el grupo de ligamiento o cromosoma 2. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zygiar et al. (2005), en donde la variación fenotípica explicada por *fw2.1* asciende hasta 62%, haciendo de este QTL de gran interés en mejora genética.

Además, se identificaron dos regiones en el cromosoma 4, *fw4.1* y *fw4.2*, que representan menor porcentaje de variabilidad del peso del fruto (17% y 25%, respectivamente). Barchi et al. (2009) y Lu et al. (2012) también concluyeron que en el cromosoma 4 había una región asociada con el peso del fruto (*Lfw4.1* y *qMFW4.1*) que era responsable del 13-15% de la variabilidad de dicho carácter. Otros cromosomas en los que aparecen QTLs asociados con el peso son el cromosoma 1, donde se ha encontrado una región (*LG1_8*) que explica el 38% de la variabilidad del peso del fruto (Eggink et al., 2014); el cromosoma 11, en el cual Wei et al. (2020) han identificado *qFW11*, responsable de un 38% de la variación del fenotipo; y el cromosoma 7, con la región *PD_FWg7.1* identificada por Lee et al. (2020). Esto nos permite concluir que el peso del fruto es un carácter poligénico con una genética compleja, ya que encontramos regiones asociadas a dicho carácter en numerosos cromosomas.

Dado que en la actualidad los marcadores moleculares más empleados son los SNPs, cada vez hay más estudios de asociación de dichos marcadores con características del fruto. Nimmakayala et al. (2016) identificaron 16 SNPs asociados al peso del fruto repartidos por los 12 cromosomas de pimiento, excepto los cromosomas 4 y 7. Otro estudio de asociación de SNPs con características del fruto es el publicado recientemente por Lee et al. (2020), en el que se identificaron 28 SNPs dispersos por diferentes cromosomas (1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11 y 12).

Algunos de los QTLs más importantes en fruto tienen sus respectivos ortólogos en tomate, como son *fw2.1* y *fw 3.2*. Un QTL muy conocido e importante de tomate es *fw2.2*, u *ovate*, que está asociado con la forma del fruto. La relación entre *fw2.1* de pimiento y *fw2.2* de tomate es algo confusa, ya que dicho QTL de pimiento se colocaliza con *ovate* de tomate; sin embargo, *fw2.1* de pimiento corresponde con *fw2.1* de tomate, con otra localización. Esto puede ser debido a una inversión de la parte más distal del cromosoma 2 de tomate respecto a pimiento (Zygier et al. 2005).

b. Índice de forma del fruto

Numerosos estudios han demostrado la existencia de QTLs asociados con la forma del fruto a lo largo del genoma de *C. annuum*, destacando los de mayor efecto en los cromosomas 1, 3, 4 y 10 (Tabla 2). Uno de los QTLs más importantes es el

identificado por Chaim et al. (2001), *fs3.1*, localizado en el cromosoma 3 de pimiento y responsable del 63-67% de la variación fenotípica del carácter. Este QTL fue estudiado posteriormente por Chaim et al. (2003a), quienes concluyeron que el modo de acción de *fs3.1* en el crecimiento de las dimensiones del fruto es distinto en función del fondo genético. En el cromosoma 10 se ha identificado un locus significativo ligado a la forma del fruto, *fs10.1*, que representa el 45% de la variación de la forma (Chaim et al., 2003b). Además, se vio que dicho QTL estaba ligado a su vez con el locus *A*, responsable del contenido en antocianinas del fruto y presente también en tomate y patata. *Fs10.1* interviene en la regulación de la forma de las células durante las dos primeras semanas de desarrollo del fruto (Borovsky y Paran, 2011). Zygier et al. (2005) localizaron dos regiones en el cromosoma 4 asociadas con el índice de la forma del fruto, *fs4.1* y *fs4.2*, siendo la última la que tenía un efecto mayor en el fenotipo (26%). Estos QTLs se colocan con dos de los QTLs asociados con el peso del fruto (*fw4.1* y *fw4.2*) demostrando la relación entre ambos caracteres. Se han encontrado otras regiones ligadas a la forma del fruto en el cromosoma 1: *LG1_8*, que coincide con la anteriormente mencionada asociada al peso y que además está relacionada con la composición bioquímica del fruto responsable del sabor, de manera que el fruto tendrá más sabor (más concentración en compuestos volátiles) cuanto más pequeño sea (Eggink et al., 2014). Otros QTLs de menor efecto se encuentran en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10, destacando una región del cromosoma 5 que está ligada con un QTL de resistencia al patógeno *Phytophthora capsici* (Naegele et al., 2014).

Entre los estudios de SNPs asociados al índice de forma del fruto destaca el llevado a cabo por Colonna et al. (2019). Los SNPs de mayor importancia identificados son los localizados en los cromosomas 3 y 10. El SNP más destacado observado en el cromosoma 3 (SNP 3:183386147) está localizado en la región *fs3.1* y tiene una fuerte relación con las distintas formas que podemos encontrar en la amplia gama de variedades de pimiento actual. En el cromosoma 10 nos encontramos varios SNPs con relativa importancia dentro de la región *fs10.1* (SNP 10:33557960, SNP 10:28759675). Resultados similares son los obtenidos por Du et al. (2019).

Las relaciones de sintenia entre los distintos géneros de la familia *Solanaceae* no están tan definidas como en el caso de los QTLs asociados al peso del fruto. Uno de los QTLs comunes entre pimiento y tomate resulta ser de menor efecto en pimiento, *fs8.1* (Bororvsky y Paran, 2011; Paran y van der Knaap, 2007). Sin embargo, en patata sí que se ha identificado una región ortóloga a *fs10.1*, el gen *Ro*, responsable de la forma elongada del tubérculo (Bororvsky y Paran, 2011; Zhang, 2009).

c. Diámetro o anchura del fruto

Al igual que en las anteriores características, se han encontrado QTLs, tanto de efecto mayor como menor, repartidos por la mayoría de los cromosomas de *C. annuum* (Tabla 2). En el estudio realizado por Chaim et al. (2001) se identificó un locus responsable del 37-42% de la variabilidad fenotípica, denominado *fd3.1*. Este QTL es de gran importancia ya que también fue asociado por Rao et al. (2003), en donde la contribución de dicho locus a la variabilidad del fenotipo era menor (10-11%); y por Mimura et al. (2012), donde la influencia de dicho QTL en el carácter era similar a la obtenida por Chaim et al. (2001), 37-38%. Asimismo, en el cromosoma 3 se identificó otra región ligada a la anchura del fruto, *FD3.2* (Han et al., 2016). Rao et al. (2003) descubrieron a su vez en el cromosoma 2 un QTL ligado al diámetro del fruto, *fd2.1*, responsable del 10-15% de la variación. Esta región se corresponde con la observada por Dwivedi et al. (2015), *Qfw.iivr.2.1*. En el cromosoma 1 también se han encontrado regiones asociadas con el carácter en cuestión: *qFWd1* (Lu et al., 2012); *FD1* (Han et al., 2016); y *LG1_8*, que colocaliza con QTLs de peso del fruto, de índice de forma del fruto y de composición bioquímica de este (Eggink et al., 2014). Algunos QTLs de efecto menor han sido identificados por Yarnes et al. (2013) en los cromosomas 3, 4, 5, 6, 9 y 11. Además de los QTLs, también se han analizado SNPs ligados directamente con la anchura del fruto, apareciendo varios en el cromosoma 8 (3 SNPs) (Wu et al., 2019) y en el cromosoma 9 (2 SNPs) (Lee et al., 2020).

Diversos QTLs menores asociados al diámetro del fruto de pimiento tienen sus ortólogos en tomate: *fd1.1*, *fd2.1*, *fd4.1*, *fd11.2* (Rao et al., 2003; Lippman and Tanksley, 2001).

d. Longitud del fruto

La longitud del fruto es otro de los caracteres importantes en la diversidad de variedades de pimiento actual. Debido a esto son numerosos los estudios en los que se analizan los QTLs asociados con dicho carácter (Tabla 2). Los cromosomas en los que nos encontramos loci ligados a la longitud del fruto que representan la mayor variabilidad del fenotipo son el 2, el 3 y el 4. Numerosos análisis han identificado en el cromosoma 3 una región común, denominada *fl3.1*, responsable de hasta el 51-52% de la variación fenotípica en la longitud (Mimura et al., 2012; Chaim et al., 2001; Han et al., 2016; Wei et al., 2020). En diferentes investigaciones se han encontrado otras regiones en el cromosoma 3 asociadas en menor medida con la longitud del fruto: *Qfl.iivr.3.2* (Dwivedi et al., 2015) y *fl3.2* y *fl3.3* (Han et al., 2016). El cromosoma 2 presenta también un QTL de interés, denominado *fl2.1* o *pauf2.1* según si fue obtenido por Rao et al. (2003) o Arjun et al. (2017), respectivamente, que es responsable del 13-25% de la variabilidad fenotípica. Aunque en este caso representan menor variabilidad del fenotipo también interesa destacar los loci encontrados en el cromosoma 4 por Barchi et al. (2009) y Lu et al. (2012); y en el cromosoma 10 por Eggink et al. (2014). Otros QTLs menores fueron localizados en los cromosomas 2, 3, 4, 11 y 12 por Yarnes et al. (2013). Respecto a los SNPs relacionados con la longitud del fruto de pimiento, Lee et al. (2020) identificaron un SNP en el cromosoma 4 altamente correlacionado con dicho carácter.

Son pocas las relaciones de sintenia entre las solanáceas en lo que se refiere a QTLs ligados a la longitud del fruto. Las regiones *fl2.1* y *fl3.1* podrían tener sus ortólogos en tomate (Rao et al., 2003; Lippman y Tanksley, 2001). En el caso de pimiento y berenjena se han observado regiones asociadas a la longitud del fruto con similares localizaciones. A partir de esto, Rinaldi et al. (2016), propusieron la hipótesis de que el clustering en la misma región de los QTLs asociados a características interesantes en mejora genética podría ser debida a la colocalización de genes involucrados en la proliferación celular, la elongación celular o ambas.

e. Grosor o anchura del pericarpio

Los estudios en los que se analiza la anchura del pericarpio son menos numerosos (Tabla 2). Destaca una vez más el cromosoma 3, en el que se han encontrado dos regiones asociadas con dicho carácter: *pt3.1*, cuyo porcentaje de variabilidad fenotípica es de 34-37% (Chaim et al., 2001) y *perwd3.2*, con una influencia menor (6-10%) (Rao et al., 2003). En el cromosoma 2 también se ha observado una región involucrada en la anchura del pericarpio responsable de una variabilidad del 21% (*Qfl.iivr.2.1*) (Dwivedi et al., 2015). Además, se han identificado QTLs menores asociados con dicho carácter en los cromosomas 4, 9, 10, 11 y 12 (Rao et al., 2013; Barchi et al., 2009; Yarnes et al., 2013; Naegele et al., 2014). Entre estos destaca una región del cromosoma 4, identificada por Naegele et al. (2014), que está asociada a su vez con la resistencia a *Phytophthora capsici* de manera que, cuanto menor es la anchura del pericarpio mayor resistencia tendrá el fruto a la infección por dicho patógeno. Los estudios de asociación de SNPs con la anchura del pericarpio son escasos destacando el realizado por Lee et al. (2020), en el que se detectó un SNP en el cromosoma 4 que resultó estar ligado también al peso del fruto.

En lo que se refiere al grosor del pericarpio, se han detectado relaciones de ortología entre tomate y pimiento en QTLs que resultan ser menores en pimiento, como son *perwd1.1* (Rao et al., 2003; Fulton et al., 2000) y *pet10.1*, ortólogo de *pcp10.1* de tomate (Barchi et al., 2009; Frary et al., 2004).

A partir de los datos mencionados anteriormente, podemos observar que las características del fruto están asociadas principalmente a los cromosomas 2, 3 y 4. Según expuso Rao et al. (2003) y habiendo sido apoyado por numerosos estudios posteriores (Tabla 2), podemos encontrar una colocación de diferentes QTLs asociados con distintas características. En el cromosoma 2 se identifican en las mismas posiciones loci asociados con el peso, la longitud y el diámetro del fruto (*fw2.1*, *fl2.1* y *fd2.1*); en el cromosoma 3, peso, longitud, diámetro, forma del fruto y grosor del pericarpio (*fw3.1*, *fl3.1*, *fd3.1*, *fs3.*, *perwd3.1*); en el cromosoma 4, diámetro y forma del fruto (*fd4.1* y *fs4.1*) y forma y peso del fruto (*fw4.1*, *fs4.1*; *fw4.2*, *fs4.2*) (Zygier et al., 2005); y en el cromosoma 8, peso y diámetro (*fw8.1* y *fd8.1*). Asimismo se han

identificados SNPs comunes para varios caracteres: un SNP en el cromosoma 4 asociado tanto al peso del fruto como al grosor del pericarpo; y 5 SNPs en el cromosoma 9, y 2 en el cromosoma 12 ligados al peso y a la anchura del fruto (Lee et al., 2020). El hecho de que diferentes QTLs mapeen en las mismas posiciones puede ser debido a efectos pleiotrópicos o a ligamientos entre los QTLs. Esto podría ser consecuencia de que diferentes características del fruto estén relacionadas fisiológicamente o con el desarrollo del mismo (peso de fruto, anchura de pericarpo, forma del fruto).

2. GENES ASOCIADOS CON CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO EN EL GENOMA DE *CAPSICUM*

El genoma de *C. annuum* presenta un tamaño de 3-3.5 Gb, contiene en torno a 35000 genes y el 80% está ocupado por elementos repetitivos (Tripodi et al., 2016). A pesar de la gran cantidad de genes estimada, pocos son los genes anotados (Wang and Bosland, 2006). Dado que la genética de las características del fruto es compleja, los genes que han sido asociados a los caracteres de interés en pimiento se han identificado gracias a su determinación en otras especies de la familia *Solanaceae*. En tomate se han aislado 6 genes que controlan la forma y el tamaño del fruto, estos son: *LC*, que codifica *WUSCHEL*; *FASCIATED*, que codifica *CLAVATA3*; *FW2.2*, que codifica *CELL NUMBER REGULATOR (CNR)*; *FW3.2*, que codifica *SIKLUH*; y *SUN* y *OVATE* (Hill et al., 2017). En el genoma de pimiento se han encontrado una única copia de cada uno de los genes anteriores de tomate relacionados con la forma y el tamaño. Según lo esperado, los cromosomas en los que se encuentran dichos genes son los mismos que en los que se han mapeado los QTLs más importantes asociados con los caracteres estudiados del fruto (2 y 3). En el cromosoma 2 se encuentran los genes *CaOVATE*, *CaWUS* y *CaCNR*, que se incluyen en algunos de los loci mencionados anteriormente (Tabla 2), como se puede apreciar en la figura 2. Sin embargo, hay importantes QTLs ligados a los caracteres de interés (Figura 2) que no mapean con dichos genes, lo que lleva a pensar que hay más genes desconocidos que intervienen en el control genético de la forma y el tamaño del fruto de pimiento. El cromosoma 3 también es de gran importancia por los numerosos QTLs identificados, encontrándose en él también el gen *CaKLUH*, relacionado con el peso del fruto (Figura 3). Los otros dos genes restantes homólogos a los de tomate se encuentran en el cromosoma 6 (*CaCLAVATA3*) y en el

cromosoma 10 (*CaSUN*) (Hill et al., 2017). Algunos de los genes anotados relacionados con la forma son: el gen *P*, de herencia dominante, que determina el ápice en forma de punta del fruto; el gen recesivo *fb*, relacionado con la base del fruto no abultada; el gen *ce*, también recesivo, involucrado en el cáliz encerrado alrededor de la base del fruto; y el gen *O*, gen dominante responsable de la forma redonda del fruto (Peterson, 1959).

El gen *CaOVATE*, también denominado Ca02g22830, se encuentra en el cromosoma 2 y está formado por dos exones, de longitud 613 bp y 395 bp, respectivamente, separados por un intrón de 539 bp y con una región 3'-UTR de 66 bp. Este gen interviene en la determinación de la forma del fruto de pimiento (Tsaballa et al., 2011). Tsaballa et al. (2011) compararon el genoma de dos variedades de pimiento (*C. annuum*), alargado (Piperaki Long) y redondo (Mytilini Round), y descubrieron varios SPNs relacionados significativamente con la forma. Entre ellos destaca un SNP en el primer exón, en la posición 419, que permite diferenciar la forma del fruto, presentando una guanina cuando se trata de fruto alargado o una citosina, en el caso de fruto redondo. Asimismo se identificó otro SNP en el intrón, en la posición 746. Junto con los polimorfismos, en dicho estudio se analizó la expresión del gen en ambas variedades, mostrando diferencias en el patrón de expresión, tanto temporales como cuantitativas. Para corroborar una vez más su papel en el control genético de la forma del fruto, se llevó a cabo un silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), que derivó en un cambio de forma en los frutos (Tsaballa et al., 2011).

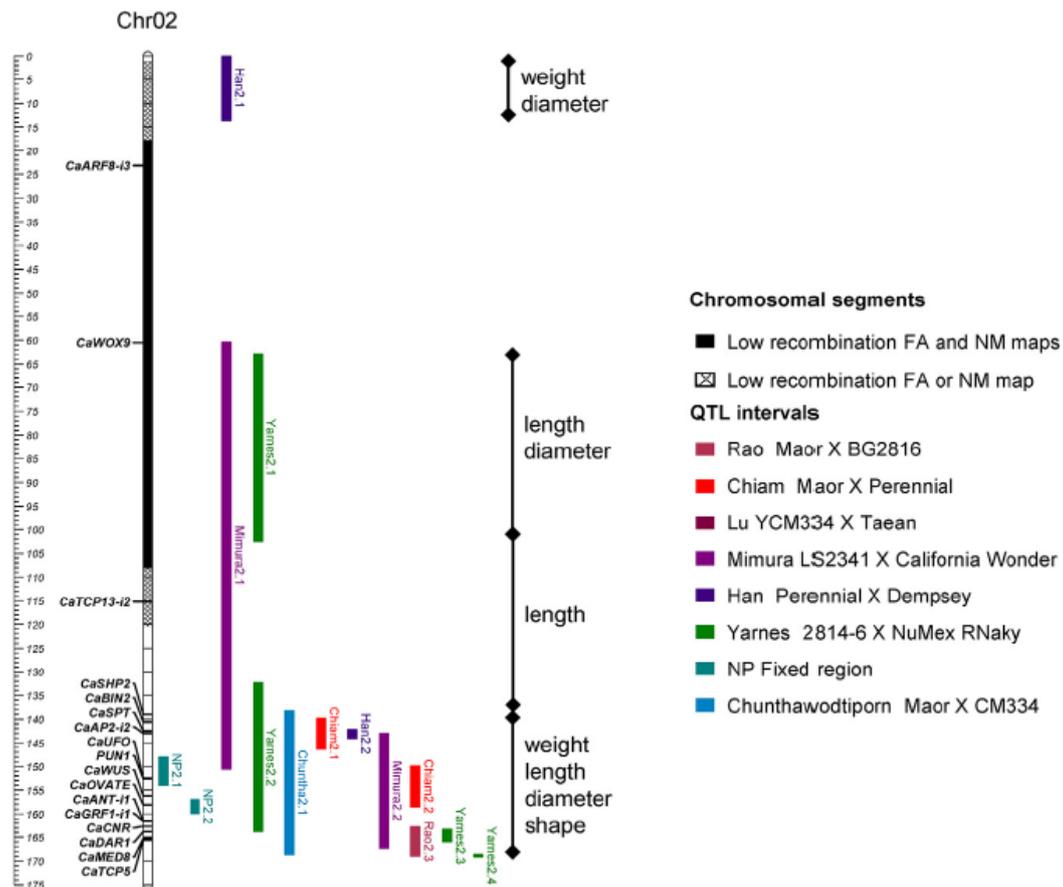


Figura 2: Representación de las regiones asociadas a QTLs del cromosoma 2 de pimiento. A la derecha se muestra una regla de los intervalos de 5-Mb del cromosoma 2 (Chr02). Los genes involucrados en el desarrollo se indican en las posiciones del cromosoma como líneas negras. Las barras de colores indican los QTLs asociados a las características del fruto en diferentes estudios, algunos de ellos incluidos en la Tabla 2. Se aprecia una concentración de QTLs y genes relacionados con aspectos del fruto en la parte inferior del cromosoma 2. (Hill et al., 2017).

El gen *CaKLUH*, relacionado con el peso del fruto, se encuentra localizado en el cromosoma 3, en la región del QTL *fw3.2*. Gracias a su caracterización en tomate por Chakrabarti et al. (2013), se ha identificado como una enzima p450 de la familia CYP78A. Esta enzima está involucrada en el aumento del peso del fruto, ya que se produce un agrandamiento de los tejidos del pericarpo y del tabique debido a un incremento en el número de células. Asimismo se ha identificado un SNP en el promotor que podría estar relacionado con el incremento de masa del fruto (Chakrabarti et al., 2013).

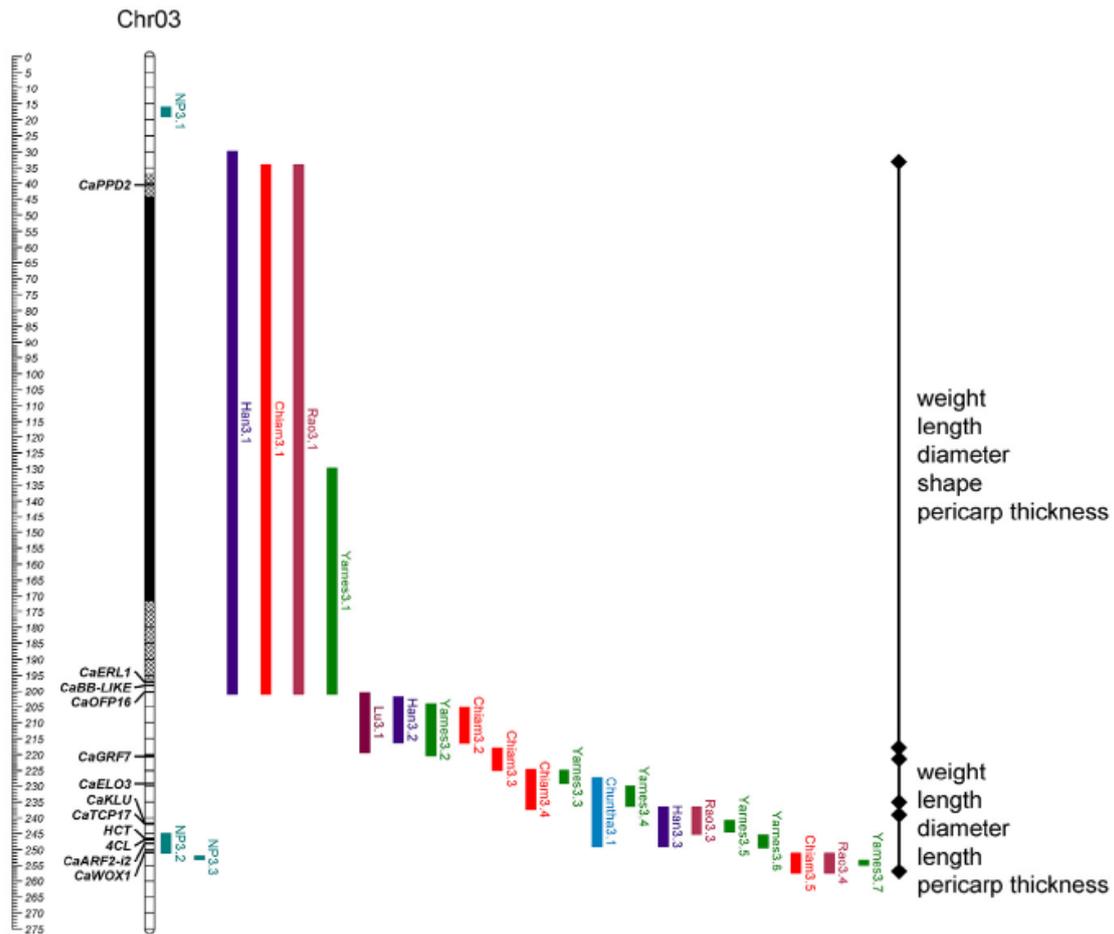


Figura 3: Representación de las regiones asociadas a QTLs del cromosoma 3 de pimienta. A la derecha se muestra una regla de los intervalos de 5-Mb del cromosoma 2 (Chr02). Los genes involucrados en el desarrollo se indican en las posiciones del cromosoma como líneas negras. Las barras de colores indican los QTLs asociados a las características del fruto en diferentes estudios, algunos de ellos incluidos en la Tabla 2. Se aprecia una concentración de QTLs y genes relacionados con aspectos del fruto en la parte inferior del cromosoma 3. La leyenda es la misma presentada en la Figura 2. (Hill et al., 2017).

Debido al gran crecimiento y desarrollo de las técnicas de genotipado, cada vez son más los estudios basados en la asociación de SNPs con genes candidatos reguladores de la forma y el tamaño del fruto de pimienta (Tabla 3). Destaca el estudio de Colonna et al. (2019), anteriormente mencionado, en el que se identificaron varios SNPs (SNP 3:183386147, SNP 10:33557960, SNP 10:28759675) altamente asociados a la determinación de la forma del fruto de pimienta. El SNP 3:183386147, presenta dos alelos, T y C, que codifican para los aminoácidos fenilalanina y leucina, respectivamente. Dicho polimorfismo se encuentra en el tercer exón del gen Ca03g16080, el cual no tiene ningún homólogo en pimienta, y está incluido en el QTL *fs3.1*. Ca03g16080 parece que codifica una proteína tipo LONGIFOLIA 1, homóloga a las proteínas LONGIFOLIA 1 y LONGIFOLIA 2 de *Arabidopsis* y SLG7 de *Oryza sativa*.

Tanto LONGIFOLIA como SLG7 activan la expansión longitudinal de los órganos. En pimiento, el gen *Longifolia 1*, se expresa en las hojas y en las etapas inmaduras del fruto. Mediante predicciones bioinformáticas se determinó que se trata de una proteína de localización nuclear involucrada en la unión entre proteínas, la exportación del núcleo y el transporte del RNA. Sin embargo, actúa en sinergia junto con otros genes, aún desconocidos, en la determinación de la diversidad morfológica (Colonna et al., 2019).

Tabla 3: Lista de SNPs significativos asociados a características del fruto de pimiento (Nimmakayala et al., 2016; Lee et al., 2020). Chr: cromosoma.

Marcador SNP	Chr	Alelos posibles	Gen	Función
S04_211848210	4		Proteína tipo Agamous MADS-box	Desarrollo reproductivo. Regulación longitud del fruto.
S04_227983120	4	G ó C	Tipo factor regulador del crecimiento	Regulación anchura de pericarpo y peso del fruto.
S06_194967541	6		Tipo peroxidasa 41	Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico. Regulación peso del fruto.
S6_202147247, S6_202147285, S6_202147337, S6_202147420	6	C ó T G ó A	Proteína STYLOSA	Regulación de la identidad floral de órganos. Importante interacción con <i>FASCIATED</i> en la determinación del tamaño, forma y peso del fruto.
S6_227195619	6	C ó G	Proteína del cloroplasto tipo FAF	Importante en la interacción WUS-CLV3. Altamente ligado con el peso del fruto.
S09_133144036	9		Factor de elongación tipo 1 β	Crecimiento y desarrollo de la planta. Regulación de la anchura y el peso del fruto.
S09_136634573	9		Proteína no caracterizada	Regulación de la anchura y el peso del fruto.
S09_138787607, S09_138787665	9	T ó C/G	mRNA- cap guanina-N7 metiltransferasa 1	Regulación de la anchura del fruto.
S09_169434758	9	A ó G	Subunidad 1 RNA polimerasa dirigida por DNA	Regulación de la anchura del fruto.
S9_250224149	9	C ó T	Subunidad α de peptidasa de procesamiento mitocondrial	Procesamiento de proteínas.
S12_72971688	12	G ó T	Receptor kinasa CLAVATA1/ Repetición pentatricopéptido	Regulación de la organización estructural del meristemo y la diferenciación celular/ Procesamiento del tránsito del péptido.

Otros SNPs identificados se asocian con factores de transcripción específicos de plantas involucrados en el desarrollo de los meristemos y de las hojas; en la formación de las semillas y las flores; en el desarrollo de las raíces; en la coordinación del crecimiento cuando la planta se ve sometida a condiciones ambientales adversas; y en procesos de inmunidad y defensa (Lee et al., 2020).

3. APLICACIÓN PRÁCTICA

A partir de la información anteriormente detallada, una sugerencia de mejora sería la generación de un cruce entre las variedades de *C. annuum*, Maor y Piperaki Long. La variedad materna, Maor, se caracteriza por tener frutos pesados, de textura suave, tipo *blocky*, con un pericarpo fino y gran cantidad de semillas. Sin embargo, el fenotipo del parental Piperaki Long, se trata de un fruto más ovalado, alargado. Mediante el desarrollo de RILs (*recurrent inbred lines*), actuando la variedad Maor como parental recurrente, podríamos conseguir una variedad de pimiento, con las características de peso y anchura del pericarpo de Maor, pero con una forma intermedia entre las variedades *blocky* y Lamuyo; es decir, frutos de un tamaño medio, con peso alto y pericarpo fino. Para conseguir dicha variedad de la manera más eficiente, sería necesario el uso de marcadores moleculares. Los marcadores más precisos son los SNPs, destacando en este ensayo el SNP anteriormente mencionado en el gen *CaOVATE*, situado en el primer exón en la posición 419. En este locus interesa que el alelo fijado sea la guanina, debido a que está asociado con una forma más alargada como la del parental Piperaki Long. Otro SNP involucrado en el cruce sería el identificado por Lee et al. (2020) en el cromosoma 4, S04_227983120. El alelo a fijar en este locus sería también la guanina, ya que se ha visto que está ligado a un aumento del tamaño del fruto con una anchura del pericarpo menor. Esta última característica se ha asociado a una mayor resistencia a *Phytophthora capsici*, pudiendo aportar puntos extra a la variedad resultante.

SELECCIÓN GENÓMICA (GS)

La selección asistida por marcadores se puede utilizar directamente en el caso de QTLs que tengan grandes efectos en el fenotipo. Sin embargo, como hemos visto en la información expuesta anteriormente, la mejora de caracteres cuantitativos de importancia agronómica mediante selección asistida por marcadores resulta ineficiente debido a la acumulación de múltiples alelos en diferentes localizaciones del genoma. Para mejorar la eficiencia y la precisión en los procesos de mejora, Meuwissen et al. (2001) sugirieron el método de predicción genómica. Este método facilita la rápida selección de genotipos superiores lo que acelera los ciclos de mejora. La selección genómica se basa en el empleo de suficientes marcadores a lo largo del genoma que cubran todos los bloques de ligamiento para poder capturar toda la variación genética de todos los QTLs, de manera que dicha variación genética sea explicada por los marcadores. De este modo la GS puede obtener incluso el efecto pequeño que tienen muchos de los QTLs. De forma general, la GS se lleva a cabo con dos poblaciones, la población de entrenamiento (*training population*) y la población de prueba (*test population*). Los modelos estadísticos estiman los efectos de los marcadores de la población de entrenamiento, de la que se dispone de la información genotípica y fenotípica de los caracteres de interés. Después, con los modelos estimados de los efectos de los marcadores se predicen los datos fenotípicos de la población de prueba (Hong, 2020).

Se han llevado a cabo muchos estudios de GS en la mejora genética de plantas, centrándose en cultivos extensivos. En la familia *Solanaceae* se ha realizado en tomate y patata, siendo el estudio de Hong (2020) el único realizado en pimiento. Gracias al aumento de los datos de genotipado y fenotipado, el desarrollo de la selección genómica está mejorando, convirtiéndose en un método prometedor para la mejora genética, tanto animal como vegetal (Hong, 2020).

CONCLUSIONES

En los últimos años se han identificado numerosos QTLs ligados a características importantes del fruto que han sido empleados mediante la introgresión de los alelos de interés en líneas élite. En este estudio destaca la concentración de loci asociados con la longitud, la anchura, la forma y el peso del fruto, y la anchura del pericarpio en los cromosomas 2 y 3. La disponibilidad del genoma secuenciado de *C. annuum* y de los marcadores moleculares de tipo polimorfismos de único nucleótido (SNPs), junto con los nuevos métodos de genotipado por secuenciación, permiten investigar genes candidatos que colocalicen con los QTLs ya mapeados. Sin embargo, en muy pocos casos dichos genes son caracterizados (*CaOVATE*, *CaKLUH*). Una alternativa a la mejora genética basada en el mapeo de QTLs es la selección genómica, con la que se pueden crear variedades con características agronómicas muy interesantes mediante la hibridación interespecífica. Sin embargo, esto no evita las limitaciones debidas a las barreras genéticas y la incompatibilidad entre especies. La transgénesis y la edición genómica mediante CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*) son técnicas prometedoras, pero a día de hoy resultan difíciles de aplicar en pimiento. Por ello, es esencial una potenciación de la investigación de los recursos genéticos de pimiento y su relación con las características de interés agronómico. En general, la integración de la genómica, la genética y las nuevas tecnologías de mejora genética de plantas permiten desarrollar variedades, tanto de pimiento como de otros vegetales, cada vez más atractivas desde el punto de vista agronómico y económico.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquadro, A., Barchi, L., Portis, E., Nourdine, M., Carli, C., Monge, S., ..., Lanteri, S.** (2020). Whole genome resequencing of four Italian sweet pepper landraces provides insights on sequence variation in genes of agronomic value. *Scientific Reports*, 10: 1-16.
- AlBallat, I. A., Ahmed, M. E., Ommran, S., Alkadah, K. A. G.** (2019) HETEROSIS, COMBINING ABILITY AND HERITABILITY OF FRUIT YIELD AND QUALITY TRAITS IN BLOCKY YELLOW SWEET PEPPER. *Egypt J. Plant Breed* 23: 1267-1297.
- Alimi, N. A., Bink, M. C. A. M., Dieleman, J. A., Nicolaï, M., Wubs, M., Heuvelink, E., ..., Van der Heijden, G. W. A. M.** (2013). Genetic and QTL analyses of yield and a set of physiological traits in pepper. *Euphytica*, 190: 181-201.
- Alremi, F., Taskın, H., Sönmez, K., Buyukalaca, S., Ellialtioglu, S.** (2014) Effect of genotype and nutrient medium on anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk J Agric Nat Sci* 1: 108–116.
- Arjun, K., Dhaliwal, M. S., Jindal, S. K., Fakrudin, B.** (2018). Mapping of fruit length related QTLs in interspecific cross (*Capsicum annuum* L.× *Capsicum galapagoense* Hunz.) of chilli. *Breeding science*, 17073.
- Barchi, L., Lefebvre, V., Sage-Palloix, A. M., Lanteri, S., Palloix, A.** (2009). QTL analysis of plant development and fruit traits in pepper and performance of selective phenotyping. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 1157-1171.
- Bleas, M.J., De Grandis, S.A., Lee, H., Trevors, J.T.** (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21: 99–114.
- Borovsky, Y., Paran, I.** (2011). Characterization of fs10.1, a major QTL controlling fruit elongation in *Capsicum*. *Theoretical and applied genetics*, 123: 657-665.
- Bosland P.W., Votava E.J.** (1999) Peppers. Vegetable and spice capsicums. In: *Crop production science in horticulture*, vol 12. 1st edn. CABI, United Kingdom.
- Buyukalaca, S., Comlekcioglu, N., Abak, K., Ekbic, E., Kilic, N.** (2004) Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *Eur J Hort Sci* 69: 206–209.
- Carrizo C., Barfuss M.H.J., Sehr E.M., Barboza G.E., Samuel R., Moscone E.A., Ehrendorfer, F.** (2016) Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*). *Annals of botany* 118: 35–51.
- Chaim, A. B., Paran, I., Grube, R. C., Jahn, M., Van Wijk, R., Peleman, J.** (2001). QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1016-1028.
- Chaim, A. B., Borovsky, Y., Rao, G. U., Tanyolac, B., Paran, I.** (2003a). fs3. 1: a major fruit shape QTL conserved in *Capsicum*. *Genome*, 46: 1-9.
- Chaim, A., Borovsky, Y., De Jong, W., Paran, I.** (2003b). Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10. 1, a major fruit-shape QTL in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 889-894.
- Chakrabarti, M., Zhang, N. A., Sauvage, C., Muñoz, S., Blanca, J., Cañizares, J., ..., Causse, M.** (2013). A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 17125-17130.

- Chee, M., Lycett, G.W., Foan, C.** (2018) Development of a direct transformation method by GFP screening and in vitro whole plant regeneration of *Capsicum frutescens* L. *Electron J Biotechnol* 34: 51–58.
- Chunthawodtiporn, J., Hill, T., Stoffel, K., Van Deynze, A.** (2018). Quantitative trait loci controlling fruit size and other horticultural traits in bell pepper (*Capsicum annuum*). *The plant genome*, 11: 1-11.
- Colonna, V., D'Agostino, N., Garrison, E., Albrechtsen, A., Meisner, J., Facchiano, A., ..., Tripodi, P.** (2019). Genomic diversity and novel genome-wide association with fruit morphology in *Capsicum*, from 746k polymorphic sites. *Scientific reports*, 9: 1-14.
- Crepieux, S., C. Lebreton, B. Servin, and G. Charmet.** (2004). Quantitative trait loci (QTL) detection in multicross inbred designs recovering QTL identical-by-descent status information from marker data. *Genetics* 168: 1737–1749.
- Daskalov, S.** (1973) Gene list for the pepper. *Genet Plant Breed* 6: 401–408.
- Daskalov, S.** (1986) Mutation breeding in pepper. In: Micke et al (ed) *Mutation breeding review*. International Atomic Energy Agency/FAO, Vienna, No. 4: 25.
- Deshpande, R.B.** (1935) Studies in Indian chillies: 4. Inheritance of pungency in *Capsicum annuum* L. *Indian J Agric Sci* 5:513–516.
- Dong, Y., Zhu, H.** (2005). Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in Molecular Medicine*, 108: 149–157.
- Du, H., Yang, J., Chen, B., Zhang, X., Zhang, J., Yang, K., ..., Wen, C.** (2019). Target sequencing reveals genetic diversity, population structure, core-SNP markers, and fruit shape-associated loci in pepper varieties. *BMC plant biology*, 19: 1-16.
- Dwivedi, N., Kumar, R., Paliwal, R., Kumar, U., Kumar, S., Singh, M., Singh, R. K.** (2015). QTL mapping for important horticultural traits in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24: 154-160.
- Eggink, P. M., Tikunov, Y., Maliepaard, C., Haanstra, J. P. W., De Rooij, H., Vogelaar, A., ..., Visser, R. G. F.** (2014) Capturing flavors from *Capsicum baccatum* by introgression in sweet pepper. *Theoretical and applied genetics*, 127: 373-390.
- Ercan, N., Sensoy, F.A., Sensoy, A.S.** (2006) Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Sci Hort* 110: 16–20.
- Eshbaugh W. H.** (1993) History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick J., Simon J.E. (eds) *New crops*. Wiley, New York, 132–139.
- FAOSTAT** (2018) www.faostat.fao.org (acceso: 14 de octubre de 2020)
- Frary, A., Fulton, T.M., Zamir, D., Tanksley, S.D.** (2004) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* 9 *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the *Solanaceae*. *Theor Appl Genet* 108: 485–496.
- Fulton, T.M., Grandillo, S., Beck-Bunn, T., Fridman, E., Frampton, A., Lopez, J., Petiard, V., Uhlig, J., Zamir, D., Tanksley, S.D.** (2000) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theor Appl Genet* 100: 1025–1042.
- Fulton, T., van der Hoeven, R., Eannetta, N., Tanksley, S.** (2002). Identification, Analysis and Utilization of a Conserved Ortholog Set (COS) Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *The Plant Cell* 14: 1457-1467.

- Gepts, P.** (2014) The contribution of genetic and genomic approaches to plant domestication. *Curr Opin Plant Biol* 18: 51–59.
- Gut, I.G.** (2001) Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mut* 17: 475–492.
- Han, K., Jeong, H. J., Yang, H. B., Kang, S. M., Kwon, J. K., Kim, S., ..., Kang, B. C.** (2016). An ultra-high-density bin map facilitates high-throughput QTL mapping of horticultural traits in pepper (*Capsicum annuum*). *DNA Research*, 23: 81-91.
- Herzog, E., Frisch, M.** (2011) Selection strategies for marker-assisted backcrossing with high-throughput marker systems. *Theor Appl Genet* 123: 251–260.
- Hill, T. A., Chunthawodtiporn, J., Ashrafi, H., Stoffel, K., Weir, A., Van Deynze, A.** (2017). Regions underlying population structure and the genomics of organ size determination in *Capsicum annuum*. *The plant genome*, 10: 1-14.
- Hong, J. P., Noh, N., Lee, H. Y., Kim, G. W., Kwon, J. K., Yamamoto, E., Kang, B. C.** (2020). Genomic Selection for Prediction of Fruit-Related Traits in Pepper (*Capsicum* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 11: 1575.
- Howard L.R., Wildman R.E.C.** (2007) Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In: Wildman REC (ed) *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, 165–191.
- Hulse-Kemp, A. M., Ashrafi, H., Plieske, J., Lemm, J., Stoffel, K., Hill, T., ..., Van Deynze, A.** (2016). A HapMap leads to a *Capsicum annuum* SNP Infinium array: a new tool for pepper breeding. *Horticulture research*, 3: 1-10.
- Hulse-Kemp, A. M., Maheshwari, S., Stoffel, K., Hill, T. A., Jaffe, D., Williams, S. R., ..., Schatz, M. C.** (2018). Reference quality assembly of the 3.5-Gb genome of *Capsicum annuum* from a single linked-read library. *Horticulture research*, 5: 1-13.
- Jung, J.K., Park, S.W., Liu, W.Y., Kang, B.C.** (2010) Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification. *Euphytica* 175: 91–107.
- Kaiser, S.** (1935) The factors governing shape and size in *Capsicum* fruits: a genetic and developmental analysis. *Bull. Torrey Bot. Club*, 62: 433–454.
- Kang, B. C., Nahm, S. H., Huh, J. H., Yoo, H. S., Yu, J. W., Lee, M. H., Kim, B. D.** (2001). An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 531-539.
- Kargbo, A., Wang, C. Y.** (2010). Complex traits mapping using introgression lines in pepper (*Capsicum annuum*). *African Journal of Agricultural Research*, 5: 725-731.
- Kesawat, M.S., Das, B.K.** (2009) Molecular markers: it's application in crop improvement. *J Crop Sci Biotechnol* 12: 169–181.
- Kim, S., Kim, K. T., Kim, D. H., Yang, E. Y., Cho, M. C., Jamal, A., ..., Hwang, J. K.** (2010). Identification of quantitative trait loci associated with anthracnose resistance in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Horticultural Science & Technology*, 28: 1014-1024.
- Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., ..., Jung, K.** (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature genetics*, 46: 270-278.
- Koleva-Gudeva, L.** (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. *Sci Hort* 111: 114–119.

- Koleva-Gudeva, L., Gulaboski, R., Janevik-Ivanovska, E., Trajkova, F., Maksimova, V.** (2013) Capsaicin— inhibitory factor for somatic embryogenesis in pepper anther culture. *Elect J Biol* 9: 29–36.
- Kumar, L.S.** (1999) DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnol Adv* 17: 143–182.
- Kumar, S., Kumar, R., Singh, J.** (2006) Cayenne/American pepper (*Capsicum* species). In: Peter KV (ed) *Handbook of herbs and spices*, vol 3. Woodhead Publishing. Cambridge, UK, 299–312.
- Kumar, S., Shieh, H.C., Lin, S.W., Schafleitner, R., Kenyon, L., Srinivasan, R., Wang, J.F., Ebert, A.W., Chou, Y.Y.** (2018) Peppers (*Capsicum* spp.): domestication and breeding for global use. In: Mandal D, Shukla AC, SiddiquiMW (eds) *Sustainable horticulture*, vol 1: diversity, production, and crop improvement, Part III. Crop improvement and biotechnology. Apple Academic/CRC Press, Waretown, NJ, USA, 387–400.
- Lee, Y.H., Kim, H.S., Kim, J.Y., Jung, M., Park, Y.S., Lee, J.S., Choi, S.H., Her, N.H., Lee, J.H., Hyung, N.I., Lee, C.H., Yang, S.G., Harn, C.H.** (2004) A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Rep* 23: 50–58.
- Lee, J., Yoon, J.B., Park, H.G.** (2008) A CAPS marker associated with the partial restoration of cytoplasmic male sterility in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol Breed* 21: 95–104.
- Lee, Y.R., Yoon, J.B., Lee, J.** (2016) A SNP-based genetic linkage map of *Capsicum baccatum* and its comparison to the *Capsicum annuum* reference physical map. *Mol Breed* 36: 61.
- Lee, J.** (2019). Development and evolution of molecular markers and genetic maps in *Capsicum* species. In: Ramchiary, Nirala, Kole, Chittaranjan, (eds.). *The Capsicum Genome*. Springer, Cham, 85-103.
- Lee, H. Y., Ro, N. Y., Patil, A., Lee, J. H., Kwon, J. K., Kang, B. C.** (2020). Uncovering Candidate Genes Controlling Major Fruit-Related Traits in Pepper via Genotype-by-Sequencing Based QTL Mapping and Genome-Wide Association Study. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1100.
- Lefebvre, V., Palloix, A., Caranta, C., Pochard, E.** (1995) Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome* 38: 112–121.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C.** (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical chemistry*, 50: 1156-1164.
- Lipmann, Z., Tanksley, S.D.** (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the smallfruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics* 158: 413–422.
- Liu, W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B., Williams, E.G.** (1990) Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Rep* 9: 360–364.
- Livak, K.J.** (1999) Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal Biomol E* 14: 143–149.
- Lu, F. H., Kwon, S. W., Yoon, M. Y., Kim, K. T., Cho, M. C., Yoon, M. K., Park, Y. J.** (2012). SNP marker integration and QTL analysis of 12 agronomic and morphological traits in F 8 RILs of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and cells*, 34: 25-34.
- Manzur, J.B., Fita, A., Prohens, J., Rodríguez-Burruezo, A.** (2015) Successful wide hybridization and introgression breeding in a diverse set of common peppers (*Capsicum annuum*) using different cultivated Ají (*C. baccatum*) accessions as donor parents. *PLoS One* 10: 1–18.
- Meuwissen, T.H., Hayes, B.J., Goddard, M.E.** (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.

- Mimura, Y., Inoue, T., Minamiyama, Y., Kubo, N.** (2012). An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding science*, 62: 93-98.
- Mohan, V., Paran, I.** (2019). Molecular Mapping and Identification of QTLs and Genes for Economically Important Traits in the *Capsicum* Genome. In: Ramchiary, Nirala, Kole, Chittaranjan, (eds.). *The Capsicum Genome*. Springer, Cham, 105-119.
- Moulin, M. M., Rodrigues, R., Bento, C. D., Gonçalves, L. S. A., Santos, J. O., Sudré, C. P., & Viana, A. P.** (2015). Genetic dissection of agronomic traits in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genet. Mol. Res*, 14: 2122-2132.
- Naegele, R. P., Ashrafi, H., Hill, T. A., Chin-Wo, S. R., Van Deynze, A. E., Hausbeck, M. K.** (2014). QTL mapping of fruit rot resistance to the plant pathogen *Phytophthora capsici* in a recombinant inbred line *Capsicum annuum* population. *Phytopathology*, 104: 479-483.
- Naegele, R. P., Mitchell, J., Hausbeck, M. K.** (2016). Genetic diversity, population structure, and heritability of fruit traits in *Capsicum annuum*. *PLoS One*, 11: e0156969.
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A., Nowaczyk, P.** (2012) Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum* spp.) genotypes. *Folia Hort* 24: 141–146.
- Nimmakayala, P., Abburi, V. L., Saminathan, T., Alaparthi, S. B., Almeida, A., Davenport, B., ..., Malkaram, S.** (2016). Genome-wide diversity and association mapping for capsaicinoids and fruit weight in *Capsicum annuum* L. *Scientific reports*, 6: 38081.
- Nowaczyk, P., Kisiała, A.** (2006) Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J Appl Genet* 47: 113–117.
- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A.** (2015) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pretreatment of *Capsicum* spp. donor plants on the anther culture efficiency of lines selected by capsaicinoid content. *Biotechnologia* 2: 179–183.
- Olszewska, D., Kisiała, A., Niklas-Nowak, A., Nowaczyk, P.** (2014) Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turk J Biol* 38: 118–124.
- Özkum, D., Tıprıdamaz, R.** (2007) Effects of silver nitrate, activated charcoal and cold treatment on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Hort* 729: 133–136
- Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M.** (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation, of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22: 18–35.
- Paran, I., van der Knaap, E.** (2007) Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J Exp Bot* 58: 3841–3852.
- Parra-Vega, V., González-García, B., Seguí-Simarro, J.M.** (2013) Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant* 35: 627–633.
- Pereira-Dias, L., Vilanova, S., Fita, A., Prohens, J., Rodríguez-Burruezo, A.** (2019). Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulture research*, 6: 1-13.
- Perry L., Dickau R., Zarrillo S., Hoist I., Pearsall D.M., Piperno D.R., Berman M.J., Cooke R.G., Rademaker K., Ranere A., Raymond S., Sandweiss D.H., Scaramelli F., Tarble K., Zeidler J.A.** (2007) Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* 315: 986–988.

- Peterson, P.A.** (1959). Linkage of fruit shape and color genes in *Capsicum*. *Genetics*, 44: 407–419.
- Pickersgill, B.** (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96: 129-133.
- Poulos J.M.** (1994) Pepper breeding (*Capsicum* spp.): achievements, challenges and possibilities. *Plant Breed Abstr* 64: 143–155.
- Prince, J.P., Pochard, E., Tanksley, S.D.** (1993) Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome* 36: 404–417.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., ..., Yang, Y.** (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 5135-5140.
- Rao, G. U., Chaim, A. B., Borovsky, Y., Paran, I.** (2003). Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1457-1466.
- Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A.** (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
- Riaz, A., Anjum, M. A., Balal, R. M.** (2020). From markers to genome based breeding in horticultural crops: an overview. *Phyton*, 89: 183.
- Rinaldi, R., Van Deynze, A., Portis, E., Rotino, G. L., Toppino, L., Hill, T., ..., Lanteri, S.** (2016). New insights on eggplant/tomato/pepper synteny and identification of eggplant and pepper orthologous QTL. *Frontiers in plant science*, 7: 1031.
- Rivera, A., Monteagudo, A. B., Igartua, E., Taboada, A., García-Ulloa, A., Pomar, F., ..., Silvar, C.** (2016). Assessing genetic and phenotypic diversity in pepper (*Capsicum annuum* L.) landraces from North-West Spain. *Scientia Horticulturae*, 203: 1-11.
- Sharma, V. K., Srivastava, A., Mangal, M.** (2020). Recent Trends in Sweet Pepper Breeding. In: Gosal, S., Wani, S. (eds) *Accelerated Plant Breeding*, Volume 2. Springer, Cham, 417-444.
- Shin, R., Park, J.M., An, J.M., Park, K.H.** (2002) Ectopic expression of Tsil in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial and oomycete pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 983–989.
- Shivanna, K.R., Bahadur, B.** (2015) Efficacy of biotechnological approaches to raise wide sexual hybrids. In: Bahadur, B., Rajam, M.V., Sahijram, L., Krishnamurthy, K.V. (eds) *Plant biology and biotechnology*, vol II. *Plant genomics and biotechnology*. Springer India, New Delhi, 347–362.
- Shuh D.M., Fontenot J.F.** (1990) Gene transfer of multiple flowers and pubescent leaf from *Capsicum chinense* into *Capsicum annuum* backgrounds. *J Am Soc Hortic Sci* 115: 499–502.
- Sinnott, E.W., Kaiser, S.** (1934). Two types of genetic control over the development of shape. *Bull. Torrey Bot. Club*, 61: 1–7.
- Srivastava, A., Mangal, M.** (2019). *Capsicum* breeding: history and development. In: Ramchiary, Nirala, Kole, Chittaranjan, (eds.). *The Capsicum Genome*. Springer, Cham, 25-55.
- Takizawa, K., Ishikawa, K., Nunomura, O., Ito, T.** (2008) Ploidy level effect on physiology of pepper plant as affected by fruit loading. *Acta Hort* 779: 689–697.
- Taskin, H., Buyukalaca, S., Keles, D., Ekbic, E.** (2011) Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *Afr J Biotechnol* 10: 17116–17121.
- Tripodi, P., Kumar, S.** (2019). The capsicum crop: an introduction. In: Ramchiary, Nirala, Kole, Chittaranjan, (eds.). *The Capsicum Genome*. Springer, Cham, 1-8.

- Tripodi, P., Acquadro, A., Lanteri, S., D'Agostino, N.** (2019). Genome Sequencing of *Capsicum* Species: Strategies, Assembly, and Annotation of Genes. In: Ramchiary, Nirala, Kole, Chittaranjan, (eds.). The Capsicum Genome. Springer, Cham, 139-152.
- Tsaballa, A., Pasentsis, K., Darzentas, N., Tsaftaris, A. S.** (2011). Multiple evidence for the role of an *Ovate*-like gene in determining fruit shape in pepper. *BMC plant biology*, 11: 46.
- Votava, E. J., Baral, J. B., Bosland, P. W.** (2005). Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany*, 59: 8-17.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., ..., Kruglyak, L.** (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280: 1077-1082.
- Wang, D., and Bosland, P. W.** (2006). The genes of Capsicum. *HortScience* 41: 1169–1187.
- Wei, J., Li, J., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Ye, Q., ..., Wan, H.** (2020). Construction of high-density bin map and QTL mapping of horticultural traits from an interspecific cross between *Capsicum annuum* and Chinese wild *Capsicum frutescens*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34: 549-561.
- Wu, F.N., Eannetta, N.T., Xu, Y.M., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, M.M., Tanksley, S.D.** (2009) A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 118: 1279–1293.
- Wu, L., Wang, P., Wang, Y., Cheng, Q., Lu, Q., Liu, J., ..., Shen, H.** (2019). Genome-Wide Correlation of 36 Agronomic Traits in the 287 Pepper (*Capsicum*) Accessions Obtained from the SLAF-seq-Based GWAS. *International journal of molecular sciences*, 20: 5675.
- Yarnes, S. C., Ashrafi, H., Reyes-Chin-Wo, S., Hill, T. A., Stoffel, K. M., Van Deynze, A.** (2013). Identification of QTLs for capsaicinoids, fruit quality, and plant architecture-related traits in an interspecific *Capsicum* RIL population. *Genome*, 56: 61-74.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G.** (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. Baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breed Sci* 56: 31–38.
- Zhang, Y.** (2009). Genetic analysis of potato tuber flesh pigmentation and shape.
- Zhao, J., Zhou, X., Zhang, Z., Yang, B., Zhou, S.** (2010) Effects of culture media on anther culture of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)* 36: 181–184.
- Zygier, S., Chaim, A. B., Efrati, A., Kaluzky, G., Borovsky, Y., Paran, I.** (2005). QTLs mapping for fruit size and shape in chromosomes 2 and 4 in pepper and a comparison of the pepper QTL map with that of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 437-445.