



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

HORA: SUBDIRECCIÓN DE PROGRAMACION Y EVALUACION

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Horticultura		
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología (Mejoramiento genético)						
Línea de investigación:	Biología y genética Hortícola						
Título del proyecto:	Mejoramiento genético de chile para producción en ambientes protegidos						
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$60,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X		
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	X	Tecnológica	e-mail del responsable		
Vinculación:	Si	No	X	Fondos concurrentes:	No		
Cooperante(s):	No						
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo				
Localidades:	Saltillo						
A realizar durante el(los) año(s):	2018 al 2019						
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma			
Responsable	Valentín Robledo Torres	Horticultura	3031				
Colaborador:	Francisca Ramírez Godina	Fitomejoramiento	1145				
Colaborador:	Rosalinda Mendoza Villarreal	Horticultura	1029				
Colaborador:	Miguel Ángel Pérez Rodríguez	Botánica	4104				
Colaborador:	Francisco Alfonso Gordillo Melgoza		externo				
Colaborador:							
		Grado por obtener	Matrícula	Firma			
Tesista:	Laura Raquel Luna García	Doctorado	41021320				
Programa Docente:	Doctorado en Agricultura Protegida						
Tesista:							
Programa Docente:							
Tesista:							
Programa Docente:							
	Vp. Bo.		Autoriza				
Firma y sello							
Nombre	Dr. Víctor Manuel Reyes Salas Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación				

Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Mejoramiento genético de chile para producción en ambientes protegidos.

2.- Introducción

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los principales cultivos hortícolas a nivel mundial, su importancia radica en que es una hortaliza muy cotizada y consumida mundialmente (Laborde y Pozo, 1984). En 2015 la producción mundial de chile fue de 28.405.270 toneladas (FAO, 2015), constituyendo el 92% del total de la producción el chile fresco. China produce el 54% de la producción mundial de chile fresco, seguido por México con un 6,5% con una producción neta de más de 2.700.000 toneladas. México ocupa el primer lugar en exportaciones a países como Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania (SAGARPA 2015). Sin embargo, cada día es más difícil cubrir las crecientes demandas del mercado, por lo que se requieren genotipos innovadores y de alto potencial genético que se adapten a condiciones de ambiente controlado, garantizando alta calidad y rendimiento de fruto y el cultivo de hortalizas tiene cada vez más relevancia debido a la necesidad de diversificación y de mejorar la calidad de los productos alimenticios (Rodríguez, 2007), además de satisfacer dichas demandas, por lo cual es importante modificarlos genéticamente con el fin de avanzar en el desarrollo de nuevos cultivares para su producción intensiva en invernadero, y lograr el máximo potencial de rendimiento y calidad, además de generar especialidades específicas para cada mercado. México es el centro de origen de *Capsicum annuum* y es por ello que posee una amplia diversidad de chiles, que oscila entre 50 tipos diferentes y que varían mucho entre sí, por lo que se le considera como la especie que presenta mayor variabilidad de ejemplares cultivados, además tiene amplia diversidad de formas, tamaños, colores, rangos de maduración y grado de pungencia (Valadez, 1998), lo cual constituye un excelente recurso para su mejoramiento genético (Laborde y Pozo, 1984). La hibridación como método de mejoramiento genético puede ser útil en la obtención de genotipos de alto rendimiento y calidad de fruto, aprovechando la capacidad combinatoria, heterosis y heterobeltiosis en el cruzamiento de progenitores (Pérez-Grajales, 2009) logrando a través de la purificación de líneas la creación de nuevos híbridos con alto vigor, mientras que por otro lado explotando la segregación y selección de los mismos para el desarrollo de nuevas variedades.

En el cultivo de chile (*Capsicum annuum*), la variabilidad genética es amplia y los recursos genéticos relacionados con el género *Capsicum* son muy importantes y adquieren gran relevancia por el potencial genético que este cultivar presenta (Bosland, 1994). Esto lo aprovechan los mejoradores como base para iniciar programas de mejoramiento y así obtener variedades o híbridos sobresalientes. La explotación de la heterosis se ha reconocido como una herramienta práctica que provee a los mejoradores de un medio para incrementar el rendimiento u otros caracteres económicos importantes, en chile se ha explotado la heterosis para incrementar el rendimiento y otros caracteres agronómicos (Seneviratne y Kannangara, 2004) y se considera que en *Capsicum* la heterosis es alta (De Sousa y Maluf, 2003), por ello, la existencia de una amplia diversidad de este género en México, tanto en el ámbito de variantes cultivadas como semicultivadas y silvestres, mismas que pueden aprovecharse para formar híbridos locales y nacionales y variedades, ya que la semilla híbrida que se usa proviene de empresas trasnacionales a precios elevados, por ello la necesidad de trabajar en su mejoramiento genético se hace cada vez más relevante, principalmente porque no existen híbridos, ni variedades de chile jalapeño, mirador y/o serrano de alto rendimiento y calidad nutricional para ambientes protegidos, por ello como alternativas proponemos avanzar en el desarrollo de materiales para su producción intensiva en invernadero, y lograr el máximo potencial de rendimiento y calidad, además de generar especialidades (colores, tamaños, formas, pungencia, calidad nutricional) para el mercado gourmet.

Objetivos

General

- Avanzar en el desarrollo de materiales de alto potencial de rendimiento y calidad de fruto.

Objetivos Específicos.

- Estudiar características de interés agronómico y calidad nutracéutica.

- Evaluar la generación F2 y seleccionar los mejores genotipos para su evaluación en la siguiente generación (F3).
- Evaluar la generación F3 y avanzar en el proceso de desarrollo de una variedad para agricultura protegida.
- Formar dobles haploides para la creación de líneas puras y formación de híbridos.

Hipótesis

- Las generaciones avanzadas no superaran en rendimiento y calidad de fruto los progenitores originalmente utilizados.
- No es posible formar haploides en el género *Capsicum annuum*.

3.-Revisión de Literatura

Origen, Importancia y Rendimientos

Capsicum es un género de plantas angiospermas, dicotiledóneas nativo de las regiones tropicales y subtropicales de América y que pertenecen a la familia de las solanáceas. Comprende 40 especies aceptadas, de las casi 200 descritas, herbáceas o arbustivas, generalmente anuales, aunque las especies cultivadas se han convertido en perennes en condiciones favorables.

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos más importantes en México por su gran consumo en la población, por el valor de su producción y por la alta demanda de mano de obra que genera. Se cultiva en casi todos los estados de la república desde altitudes a nivel del mar a los 2500 msnm, hasta el 2013 la superficie cosechada es de 143,975 ha. con un rendimiento promedio de 16.22 ton ha⁻¹ en chile jalapeño. En 2012 destacaron Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas como principales productores del cultivo con más de la mitad del volumen nacional en su conjunto. En el caso de Sinaloa, un estado con alto grado de tecnificación, se registró una cosecha de 40 t ha⁻¹, en Chihuahua, 20 ton ha⁻¹, mientras Zacatecas, el de mayor superficie sembrada reportó 7 ton ha⁻¹ (SIAP 2012-2013). Sin embargo en algunos trabajos de investigación se ha logrado incrementar este rendimiento, gracias al uso de la agricultura protegida en interacción con una fertilización adecuada, como lo indica Duarte (2012) quien menciona que la mayor producción y calidad de chile jalapeño se obtuvo con uso de gallinaza + 80N, el cual presentó un rendimiento de 65.2 t ha⁻¹, en comparación con 43.3, 17.2 y 16.2 t ha⁻¹ obtenidos con las siguientes fórmulas de fertilización; 150N-150P, 5 t ha⁻¹ de estiércol y testigo, respectivamente.

Mientras que el chile Mirador es un recurso valioso de gran importancia económica y social en la región de El Mirador, Chicontepec, Veracruz, México, además de tener un excelente sabor y la característica de no irritar el estómago, debido a que tiene una pungencia intermedia. Sin embargo, su producción se ve limitada debido a que en la etapa fenológica de floración se presenta un alto porcentaje de caída de flor (Ramírez *et al.*, 2010), por lo que dichos investigadores aplicaron algunos biorreguladores para mejorar algunas características fisiológicas y bioquímicas logrando rendimientos promedio que van de 350 a 500 gramos por planta.

En cuanto al rendimiento promedio de chile serrano se reportan 55 ton ha⁻¹ para el cultivar Tampiqueño 74, mientras que otros cultivares presentan rendimientos de 75 ton ha⁻¹ (SAGARPA-INIFAP 2010).

El rendimiento de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) en invernadero en México es 80 t ha⁻¹ con densidades de 9 a 10 plantas·m⁻² (Maroto, 1989). En Italia, manejan un promedio de 41.5 t ha⁻¹ cuando se cosecha el fruto verde, y 36.3 t ha⁻¹ cuando se cosecha maduro (Miccolis *et al.*, 1999). En Israel, el rendimiento medio es 16 kg m⁻² (Bart Tal *et al.*, 2000). En Alemania el rendimiento fue 17 kg m⁻² (Paschold y Zengerle, 2000) bajo cultivo en invernadero, mientras que Seminis (2015) reporta 150 ton ha⁻¹, concluyendo que la tecnología de producción en invernadero ha incrementado el rendimiento por unidad de superficie.

Producción en Invernadero

En México, la producción de hortalizas en invernadero se localiza en zonas desérticas del norte y en el centro del país, donde la escasez de agua limita la agricultura de riego, cultivándose principalmente tomate, pimiento y pepino. La superficie cultivada en invernadero se incrementó de 350 ha en 1997 (Steta, 1999) a 748 en 2001 (AMPHI, 2001). En el año 2004 existían 2,545 hectáreas operando y 669 hectáreas en construcción (Guantes J., 2006). Sin embargo para el 2014 se tenían 23,482.9 ha de agricultura protegida (SAGARPA, 2016). Esto se explica por la demanda de productos hortícolas de buena calidad de Estados Unidos, Canadá y el Norte de Europa, principalmente durante los meses de invierno, cuando las condiciones de luz y temperatura limitan la producción agrícola en esos países, además de la

protección de los cultivos ante el cambio climático actual. La tecnología utilizada en la producción y los diferentes tipos de estructura de invernaderos son importados de Israel, España, Canadá y Holanda (Steta, 1999). Además, mediante la tecnología de invernaderos se obtienen mayores rendimientos y mejor calidad de frutos, se puede producir cuando no es posible hacerlo a campo abierto lo que se traduce en mejores precios en el mercado (Macías et al., 2003).

Mejoramiento Genético de Plantas

El Fitomejoramiento, en un sentido amplio, es el arte y la ciencia de alterar o modificar la herencia de las plantas para obtener cultivares (variedades o híbridos) mejorados genéticamente, adaptados a condiciones específicas, de mayores rendimientos económicos y de mejor calidad que las variedades nativas o criollas. En otras palabras, el fitomejoramiento busca crear plantas cuyo patrimonio hereditario esté de acuerdo con las condiciones, necesidades y recursos de los productores rurales, de la industria y de los consumidores, o sea de todos aquellos que producen, transforman y consumen productos vegetales (Vallejo, 2002)

La aptitud combinatoria es la capacidad que tiene un individuo o una población de combinarse con otros, medida por medio de su progenie (Márquez, 1988). Se denominan cruza dialélicas a las cruza simples que pueden lograrse entre los elementos de un conjunto de líneas progenitoras y para su estudio existen varios diseños de análisis dialélico, que permiten conocer los efectos de ACG y ACE, pero el más utilizado es el de Griffing (1956 a,b), en sus cuatro métodos: 1) progenitores y sus cruza F1 directas y recíprocas, 2) progenitores y cruza F1 directas, 3) cruza F1 directas y recíprocas y 4) cruza F1 directas. Lo cual es de gran importancia para la toma de decisiones en programas de mejoramiento genético, ya que si la aptitud combinatoria específica es más importante que la aptitud combinatoria general, la formación de híbridos será más promisorio, debido a que es posible aprovechar los efectos de dominancia (Camposeco 2013).

La Heterosis es la expresión de un carácter en la progenie más allá de los límites de expresión manifestada en sus progenitores que tiene origen en los efectos genéticos principalmente de dominancia y en la diferencia genotípica de frecuencias génicas (Falconer, 1996) La Heterosis ha sido ampliamente utilizada en programas de mejoramiento de muchos cultivos para la identificación de poblaciones genéticamente divergentes, como base para el desarrollo de líneas endogámicas a ser usadas en cruzamientos F1 (Hallauer y Miranda, 1988) mientras que la Heterobeltiosis se refiere al fenómeno en el que el híbrido F1 obtenido por el cruce de dos padres genéticamente distintos muestra superioridad sobre el mejor padre en uno o una combinación de caracteres.

Diversos investigadores han reportado efectos de heterosis alta en *Capsicum* spp., para largo y diámetro de fruto, número de semillas por fruto, rendimiento y contenido de capsicina por planta (De Souza y Maluf, 2003; Seneviratne y Kannangara, 2004), rendimiento y calidad de frutos (Milerue y Nikornpun, 2000; Pérez-Grajales et al., 2009), peso de semilla por fruto, peso de 100 semillas, número de frutos por plantas (Mishra et al., 1989), contenidos de Vitamina C y capsaicinoides en diferentes grados de madurez de fruto (Cruz-Perez et al., 2007), materia seca de fruto por planta, incidencia de *Xanthomonas* (Blank y Maluf, 1997; De Souza y Maluf, 2003) y para contenido de capsicina (Zewdie et al., 2000; Zwedie y Bosland, 2000). La mayoría de esos estudios se han realizado en *C. annumm*, y en pocas investigaciones se ha determinado la magnitud de heterosis en otras especies, como *C. chinense* y *C. pubescens*.

Métodos de Selección

La selección de los métodos de fitomejoramiento y los parámetros de selección dependerán en el mecanismo de reproducción, la heredabilidad de los caracteres incluidos en el programa de mejoramiento (por ejemplo alta vs. baja heredabilidad) y el tipo de material a liberar comercialmente (por ejemplo híbrido F1, línea pura, variedad sintética, etc.)

Los métodos de selección convencionalmente utilizados incluyen Pedigree, Pedigree Modificado, Selección Masal, Selección Masal Estratificada, Selección Recurrente, Retrocruza a Línea Endogámica, entre otros.

De cada familia se deben seleccionar líneas avanzadas prometedoras y éstas deben ser evaluadas meticulosamente y comparadas a los testigos de manera rigurosa en varios ambientes

Cada ciclo el genetista selecciona el germoplasma que será avanzado a la siguiente generación y al final del ciclo de cultivo se efectúan nuevas selecciones y se vuelve a decidir qué familias o individuos pasarán a la próxima generación creando así un proceso cíclico que concluye cuando los objetivos se han logrado e híbridos exitosos son liberados y son utilizados comercialmente.

Cultivo In Vitro

Una alternativa para la generación de nuevos híbridos potenciales es la generación de líneas puras, 100% homocigotas mediante la obtención de doble haploides androgénicos, ya que es una prioridad actual para las empresas de producción de semilla híbrida, sin embargo, usando técnicas convencionales de mejoramiento genético la obtención de estas líneas puede requerir al menos seis ciclos de autofecundación (Polci et al., 2004). El empleo de herramientas como la producción in vitro de haploides y doble haploides, permite obtener líneas homocigotas hasta en una generación, reduciendo tiempo y costo de producción de estas líneas (González y Jouve, 2003; Polci et al., 2004; Maraschin et al., 2005).

Las líneas puras imprescindibles para la producción de semilla híbrida para la agricultura, se han venido obteniendo tradicionalmente mediante la fecundación de una planta por sí misma una y otra vez a los largo de muchas generaciones lo cual le supone al productor una gran inversión en tiempo, extensiones de cultivo y recursos económicos que luego traslada al precio final de la semilla es por ello que en el presente se pretende obtener una línea pura de chile especie agrícola con alta demanda.

Cultivo de Anteras: Consiste en el cultivo de anteras inmaduras en un medio de inducción, donde las micrósporas competentes originarán callos, que serán luego transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas. Chirinos (2006); trabajo con anteras de café y señala que si éstas son sometidas a bajas temperaturas, se incrementa la respuesta callogénica o embriogénica, debido a la formación de dos núcleos iguales durante la primera mitosis.

Producción Haploide: La producción de plantas haploides ha capturado un gran interés de investigadores en el área de la genética, embriología, fisiología y mejoramiento desde el descubrimiento de la primera planta haploide producida en la especie *Datura stramonium*. Las bases del cultivo de haploides tienen su fundamento, en que, en un medio de cultivo apropiado las microsporas y/o granos de polen de algunas especies pueden ser inducidas a la formación de células vegetativas a partir de ellas. Las microsporas cambian el patrón sexual normal (gametofítico) a un patrón vegetativo (esporofítico). El resultado es que en lugar de tener polen con capacidad para producir gametos y un tubo polínico, la microspora es capaz de producir proembriones o callos haploides. A la formación de plantas a partir de microsporas ó polen se le llama androgénesis (Gutiérrez et al., 2002)

Producción de Doble haploide: la producción de plantas dihaploides (DH) representa una estrategia alternativa que permite obtener una completa homocigosis y uniformidad del genotipo en un corto tiempo (2 años) y es una estrategia utilizada en un gran número de especies, entre los cuales se puede mencionar maíz, cebada (actualmente el 50 % de las variedades utilizadas en Europa provienen de doblehaploides), arroz y en varias especies medicinales. Para un uso práctico de las líneas DH en el mejoramiento, los procedimientos en la inducción para la producción de plantas haploides deben ser eficientes, no muy laboriosos e insensibles al genotipo. Los regenerantes deben crecer bien en cultivo in vitro y su genoma debe ser duplicado fácilmente; además las plantas producidas se deben aclimatar sin problemas. Por otra parte, los DH regenerados tienen que conservar su integridad genética y producir semillas fértiles (Foschi et al., 2009).

4.- Procedimiento Experimental

La presente investigación se llevará a cabo en dos etapas en el invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, México.

Se utilizó como material genético original, Chile Jalapeño Mitla, Chile Mirador, Chile Serrano Tampiqueño 74, Pimiento rojo, Pimiento amarillo, Pimiento naranja, Súper Heavy Weigth y Pimiento Capistrano, con los cuales se formaron 9 híbridos, mismos que ya fueron evaluados en su primera generación filial (Luna, 2016), de esta generación se realiza la selección de las mejores progenies para continuar con el proceso de formación de una variedad mejorada.

Etapas 1. Evaluación de Progenitores e Híbridos en generación F2.

La siembra de la semilla para la obtención de las plántulas de chile se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades utilizando como sustrato turba ácida con perlita en una relación 70:30 respectivamente, usando una semilla por cavidad, cuando alcancen 4 hojas verdaderas y/o una altura aproximada de 13 cm, las plántulas serán llevadas a trasplantar en invernadero, esto es aproximadamente 45 dds y se plantarán en camas elevadas con una distancia de 1.60 m entre camas y 30 cm entre plantas, teniendo una densidad de plantación de 41,665 plantas ha⁻¹.

Las plantas serán cultivadas bajo los procedimientos estándar del cultivo al cuál se le realizaran podas, tutorado, riegos y

fertilización en base a sus requerimientos y etapas fenológicas, aplicaciones foliares y aplicaciones de sanidad para mantener al cultivo libre de plagas y enfermedades y 30 días de trasplante se procederá a iniciar con la evaluación de características agronómicas y nutraceuticas.

En cuanto a características agronómicas se tomara en cuenta: precocidad, altura de planta, diámetro de tallo principal, número y tamaño de hojas, días a cosecha, rendimiento total de la planta, numero de frutos, peso fresco de fruto, diámetro polar y ecuatorial de fruto, número de semillas por fruto, peso fresco y peso seco total de la planta, composición química y nutricional de frutos evaluando algunos elementos minerales en fruto, además de Vitamina C, Carotenos totales y Capsaicina.

- ❖ Para las variables altura de planta, diámetro de tallo principal, número y tamaño de hojas, se medirán mensualmente iniciando 30 días después del trasplante.
- ❖ Para las variables de rendimiento (número de frutos, peso fresco del fruto, diámetro polar y ecuatorial, numero de semillas por fruto) se medirán una vez iniciada la fructificación cada 7 días.
- ❖ Para precocidad y días a cosecha, se contabilizarán los días desde el momento de trasplante hasta que aparezca la primera flor y se coseche el primer fruto.
- ❖ En el laboratorio se analizara la composición química y nutricional de los frutos, se tomara de tres cortes

De acuerdo a los resultados de estas evaluaciones se seleccionaran los híbridos más prometedores de los cuales se obtendrá semilla, misma a la que se le dará un pre-acondicionamiento (limpieza, lavado y secado) para continuar con la etapa dos.

Etapas 2. Evaluación de progenitores e híbridos interraciales en generación F3

De los genotipos más sobresalientes se procederá a la obtención de la plántula de chiles, para llevar a cabo la segunda fase. La obtención de plántula se realizará de la misma forma antes descrita, las cuales cuando estén listas serán llevadas a trasplante a evaluar bajo 3 ambientes diferentes, los cuales serán invernadero, macro túnel y malla sombra bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones con una separación entre plantas de 30 cm. El manejo del cultivo se llevará bajo los procedimientos estándar del mismo, después de 30 días de trasplantada se procederá a iniciar con la evaluación de las mismas características agronómicas y nutraceuticas que la etapa anterior, de lo cual derivara los genotipos más sobresalientes mismos que serán reservados para la evaluación de la siguiente generación.

A la par de esta etapa se estará trabajando en **cultivo de anteras** a fin de minimizar los tiempos de mejoramiento genético de la siguiente manera: El medio a emplear para el cultivo de anteras es el de Murashige-Skoog (Murashige & Skoog, 1962) a justado a un pH 5.7 los cuales serán esterilizados en autoclave.

Desinfección y Siembra; las anteras que se utilizarán para el cultivo in vitro se obtendrán de botones florales los cuales se definirá su tamaño después de realizar un estudio citológico que nos indicaran el mayor número de células en la fase de tétrada. La desinfección de las anteras se realizará con etanol al 96% durante 2 minutos luego en una solución de hipoclorito de sodio al 1.8 % durante un lapso de 10 minutos. Las anteras se sembrarán de dos maneras unas de ellas se colocarán sobre el medio de cultivo y la otra se le realizara una incisión longitudinal en la parte media.

Inducción de la embriogénesis somática: las anteras se cultivarán como explantes en frascos Gerber con 10 ml de medio MS estas se mantendrán en oscuridad durante 4 semanas para inducir la formación de callo embriogénico a una temperatura de 26°C.

Desarrollo de los embriones somáticos: para promover la diferenciación y germinación de los embriones somáticos que se formen de las anteras se cambiarán a un nuevo frasco con 10 ml de medio MS (2-4D) Aux, los cuales se tendrán 2 semanas en oscuridad y 2 semanas en un fotoperiodo de 16 horas de luz. (Lámparas de luz blanca fría fluorescente con intensidad lumínica de 25 micro mol). Las plántulas que se obtendrán se pondrán en condiciones de luz para continuar su desarrollo.

Multiplicación de plantas haploides: los ápices de vástago de las plantas haploides que serán obtenidas a partir de las anteras se cultivaran durante 4 semanas en el medio posteriormente los brotes adventicios que se formaran se individualizaran y se colocaran en medio durante 2 semanas con la finalidad de promover la formación del sistema radicular.

Análisis cromosómico: para observar los cromosomas mitóticos se colocarán los ápices radicales de las plantas regeneradas en diferentes soluciones acuosas de colchicina (0.05, 0.10, 0.15 %) por 3, 6, 9 y 12 horas de exposición a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, los ápices serán transferidos a un fijador Farmer 3:1 (etanol: ácido acético) (v/v) por 12 horas; se pondrán a hidrolizar durante 10 min en HCl 1 N a 60 °C posteriormente se con una solución de Feulgen se pinta, a 60 °C por 5 min. Los ápices teñidos se macerarán en una solución enzimática (pectinasa 2%, celulasa 5% y buffer citrato, pH 4.5) y después, se llevará a cabo la colocación de los mismos sobre portaobjetos agregando una gota de orceína propiónica al 2% para luego cubrirlos con cubreobjetos y así poder realizar el conteo y toma de fotografías de los cromosomas utilizando un microscopio.

Duplicación cromosómica: las plantas haploides regeneradas se van a extraer del medio de cultivo, se lavarán las raíces con agua corriente para eliminar residuos del mismo y se sumergirán hasta el cuello de la raíz en una solución acuosa de colchicina la cual será determinada al realizar el análisis cromosómico.

Aclimatación y trasplante: después del tratamiento con colchicina las plantas se colocarán en macetas de 10 litros con una mezcla de peat moss y perlita (1:1) v/v estas se cubrieran con bolsas de plástico transparente las cuales estarán previamente perforadas. Pasando una semana se retirarán las bolsas para llevar las plantas al invernadero donde continuaran su crecimiento y evaluaran para asegurar su establecimiento y posterior extracción de semilla.

Los datos serán analizados mediante un ANOVA con el programa Statistical analysis system (SAS v. 9.2) y se realizará la prueba de comparación de medias de Tukey $P < 0.05$ de significancia, además se evaluaran índices de selección el cual es un método muy eficiente para el mejoramiento en forma simultánea de varias características con la ayuda de la siguiente formula $IS = \{[(Y_j - M_j)^2 * I_j] + [(Y_i - M_i)^2 * I_i] + \dots + [(Y_n - M_n)^2 * I_n]\}^{1/2}$ y los efectos aditivos principales e interacciones multiplicativas (AMMI) que permiten estimar estabilidad y evaluar en diferentes ambientes y como consecuencia clasificar ambientes con la siguiente formula $Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + \sum_{k=1}^n \lambda_k \alpha_{ik} \gamma_{jk} + \epsilon_{ij}$ con el apoyo del gráfico Biplot el cual permite interpretar patrones de respuesta de los genotipos, ambientes y la interacción genotipo x ambiente (Barreto *et al*, 1991).

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cultivo In Vitro para formación de haploides	X	X	X	X	X							
Preparación de camas y sistema de riego			X									
Siembra de semillas de progenies seleccionadas		X										
Formación de doble haploides						X	X	X				
Trasplante de progenies seleccionadas				X					X			
Conducción de las progenies establecidas				X	X	X	X	X	X			
Toma de datos, cosecha y obtención de semilla						X	X	X	X			
Análisis de laboratorio								X	X	X		
Análisis estadístico de los datos									X	X		
Participación en Congreso como ponente										X		
• Este proyecto concluirá en el 2019												

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cultivo In Vitro para formación de haploides	2	2	0	2	2							
Preparación de camas y sistema de riego			10									
Siembra de semillas de progenies seleccionadas		1										
Formación de doble haploides						7						
Trasplante de progenies seleccionadas				2					2			
Conducción de las progenies establecidas				2	2	0	2	1	2			
Toma de datos, cosecha y obtención de semilla						1	1	1	1			

Análisis de laboratorio								10				
Análisis estadístico de los datos									1	0		
Participación en Congreso como ponente										6		
Total	2	3	10	6	4	8	3	12	6	6		
• Este proyecto concluirá en el 2019												

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2017	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- ❖ 1 tesis nivel doctorado.
- ❖ 1 tesis a nivel licenciatura.
- ❖ 2 presentaciones en congreso.
- ❖ 1 artículo publicado
- ❖ 1 artículo enviado
- ❖ Avance en el desarrollo de una variedad

6.-Literatura Citada

1. Asociación Mexicana de Productores de Hortalizas en Invernaderos (AMPHI). 2001. Análisis agropecuario de invernaderos. (en línea) (consultado el 15 de abril). <http://www.cea.sagar.go.mx/diagro/analisis/invermx.html>
2. Barreto, H.J and Raun, W.R. .1991. Programa Índices de Selección. Guía para la operación de software. CIMMYT., p.27.
3. Bar-Tal, A., M. Keinan, B. Aloni, L. Karni, Y. Oserovitz, S. Gantz, A. Hazan, M. Itach, N. Tartakovski, A. Avidan, and I. Posalski S. 2000. Relationships between blossom end rot and water availability and Ca fertilization in bell pepper fruit production. Acta Hort. 554: 97-103.
4. Blank, A.F., and Maluf, W.R. (1997). Gene action and eraly testing for combining ability in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.) Journal Genetics and Breeding (Italy).
5. Bosland, P.W. 1994. Chiles. History, cultivation and uses. En: Spices, herbs, and edible fungi. Charambous, G. (edit.). Elsevier Publication, New York, pp. 347-366.
6. Camposeco Montejó N., V. Robledo Torres, L. A. Valdez Aguilar, F. Ramírez Godina, R. Mendoza Villarreal, A. Benavides Mendoza.2015. Estimación de la aptitud combinatoria en poblaciones de tomate de cáscara. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 6(3):437-451.
7. Cruz-Pérez A. B., V. A. González-Hernández, R. M. Soto-Hernández, M. A. Gutiérrez-Espinoza, A. A. Gardea-Bejar, M. Pérez-Grajales. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. Agrociencia 41:627
8. De Souza, J.A. and W. R. Maluf 2003. Diallel analysis and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq). Sci. Agric. 60:105
9. Duarte, R. M., Contreras, R. L. G., & Contreras, F. R. (2012). Respuesta de la aplicación de estiércol y fertilizantes sobre el rendimiento y calidad del chile jalapeño. Biotecnia, 14(3), 32-38
10. Falconer D. S. 1996. Introducción a la Genética cuantitativa. 4ª. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España. 469 p.
11. FAO 2015. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación
12. Guantes Ruiz, Jairo. 2006., bajo supervisión de la Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México. "El mercado de los invernaderos en México. Notas Sectoriales." Instituto Español de Comercio Exterior. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México. Enero de 2006.
13. Hallauer A. R., and J. B. Miranda F. 1988. Quantitative Genetics in maize breeding. 2nd ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. Pp:60.
14. Kochieva, E.Z. y N.N. Ryzhova (2003). Molecular AFLP Analysis of the Genotypes of Pepper *Capsicum annuum* Cultivars. *Molecular Genetics* 39: 1345-1348.

15. Laborde-Cansino J.A. y Pozo-Campodónico O. 1982. Presente y pasado del chile en México. Publicación especial No. 85. INIA-SARH, México
16. Luna, García, L.R., (2016) Hibridación entre diferentes tipos de chiles y estimación de la heterosis para rendimiento y calidad de fruto. Tesis de Maestría UAAAN.
17. Macías R.H., E. Romero y J. Martínez . 2003. Invernaderos de Plástico. Cap. 6. En Agricultura Protegida. I. Sánchez Cohen (Ed.), pp 131-163. INIFAP CENID RASPA. Gómez Palacio, Dgo.
18. Maroto, B. J. V. 1989. Horticultura. Herbácea Especial. Ed. MundiPrensa. Madrid. 566 p
19. Márquez S. F. 1988. Genotecnia Vegetal. Tomo II. Métodos, Teoría, Resultados. AGT Editor. México. p. 665.
20. Miccolis, V., V. Candido, and V. Marano. 1999. Influence of harvest time on yield of some sweet pepper cultivars grown in greenhouses. *Acta Hort.* 491: 205-208.
21. Milerue N. and M. Nikornpun 2000. Studies on heterosis of chile (*Capsicum annumm* L) Kasetsart J. Nat. Sci. 34:190
22. Mishra R. S. and R. E. Lotha R., 1989. Heterosis in chilli by diallel analysis. *South Indian Hort.* 37:179
23. Pashold, P. J., and K. H. Zengerle. 2000. Sweet pepper production in a closed system in mound culture with special consideration to irrigation scheduling. *Act. Hort.* 554: 329-333.
24. Pérez-Grajales, M., González-Hernández, V. A., Peña-Lomeli, A., & Sahagún-Castellanos, J. (2009). Combining ability and heterosis for fruit yield and quality in manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 15(1), 103-109.,
25. Ramirez, H., Amado-Ramirez, C., Benavidez-Mendoza, A., Robledo-Torres, V., and Martínez Osorio, A., (2010) Prohexadiona-Ca, AG3, ANOXA, y BA modifican indicadores fisiologicos y bioquimicos de chile Mirador. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 16(2) 83-89.
26. Sagarpa 2015-2016. Secretaria De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación. http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie_agricola_protegida.aspx
27. Seneviratne, K. G. S., & Kannangara, K. N. (2004). Heterosis, heterobeltiosis and commercial heterosis for agronomic traits and yield of chilli. *Annals of the Sri Lanka department of agriculture*, 6, 195-201.
28. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción agrícola por cultivo. Disponible en línea <http://www.siap.gob.mx>
29. Sousa, J. A. D., & Maluf, W. R. (2003). Diallel analyses and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Scientia Agricola*, 60(1), 105-113.
30. Steta, M. 1999. Status of the greenhouse industry in México. *Acta Hort.* 481: 735-738.
31. Valadez, L. A. (1998). Producción de hortalizas. Editorial Limusa., Mexico, D. F.
32. Vallejo Cabrera, F. A. 2002. Mejoramiento Genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia, 402 p. CO-BAC, Bogotá.
33. Zewdie Y. and P. W. Bosland 2000. Evaluation of genotype, enviroment, and genotype-by-enviroment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annumm* L. *Euphytica* 111:185
34. Zewdie Y., P. W. Bosland and R. Steiner 2000. Combining ability and heterosis for capsaicinoids in *Capsicum pubescens*. *HortScience*. 36:1315.
35. Polci, P.; Conti, V. y Miranda, R. 2004. Obtención de plantas doblehaploides. *In: Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 137-148 p.*
36. González, J. M. y Jouve, N. 2003. Estudio del desarrollo de las microsporas en la androgénesis *in vitro* de triticales (*Triticosecale* Wittmack). *In: V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Memoria. Pamplona, España. 39 p.*
37. Maraschin, S. F.; Priester, W.; Spaink, H. P. and Wang, M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 56:1711-1726.
38. Chirinos, M. 2006. Cultivo de anteras en dos clones de yuca. *Agronomía Trop.* VE. 56(4): 633-641

39. Gutiérrez, M., Santacruz, F., Cabrera J., Rodríguez, G. 2002. Mejoramiento Genético Vegetal *In Vitro*. 2003, e-Gnosis [online] Vol.1 Art. 4. ISSN: 1665-5745.
40. Foschi, M., Martínez, L., Ponce, M, Galmarani, C. 2009. Doblehaploides, una estrategia biotecnológica para el mejoramiento genético en cebolla (*Allium cepa*). Horticultura Argentina 28(66): May.-ago. 2009.
41. Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15: 473-497