



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

VALIDACIÓN DE MARCADORES 'QTL' ASOCIADOS
AL TIPO SEXUAL Y MORFOLOGÍA DE FRUTO DE
Carica papaya L. var. MARADOL, SU
IMPLEMENTACIÓN EN LA SELECCIÓN ASISTIDA
POR MARCADORES MOLECULARES (SAM) Y
OBTENCIÓN DE LA HUELLA GENÉTICA MEDIANTE
AFLP

Tesis que presenta

MARIELA VÁZQUEZ CALDERÓN

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)



Mérida, Yucatán, México. Julio, 2014.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“VALIDACIÓN DE MARCADORES ‘QTL’ ASOCIADOS AL TIPO SEXUAL Y MORFOLOGÍA DE FRUTO DE *Carica papaya* L. var. MARADOL, SU IMPLEMENTACIÓN EN LA SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES (SAM) Y OBTENCIÓN DE LA HUELLA GENÉTICA MEDIANTE AFLP”**, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, dentro de la Opción Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.



Mérida, Yucatán, México; a julio de 2014.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

MARIELA VÁZQUEZ CALDERÓN

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me dió la fé, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo brindandome una vida llena de aprendizaje y experiencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgame la beca para realizar mis estudios de posgrado con la clave 35263.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY) por darme la oportunidad de superarme profesionalmente y por permitir el desarrollo de esta tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández por ser el director de esta investigación.

Al Dr. L. Felipe Sánchez Teyer y Al Dr. Abelardo Navarrete Yabur por aportar sugerencias importantes en este trabajo y por el tiempo invertido en la revisión de la presente tesis.

A la Dra. Nancy Santana Buzzy, al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, al Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés y al Dr. Carlos Trejo López por formar parte del comité revisor y colaborar en la revisión final de este trabajo.

A la Téc. Matilde Margarita Ortiz García y a la Téc. Adriana Quiroz Moreno por el apoyo y sugerencias en la parte técnica molecular, en los laboratorios de Marcadores Moleculares de Recurso Naturales y de Biotecnología de Plantas de este instituto, respectivamente.

Al Téc. Fernando Amilcar Contreras Martín y al Téc. Francisco Espadas y Gil por su aportación de datos útiles en el desarrollo de la parte agró-morfológica aquí reportada, además a la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz por sus sugerencias de edición de esta tesis.

Al personal de la subcoordinación de Posgrado por la atención brindada en cada paso para llevar a buen término este proceso.

A mis padres Évila Calderón R. y Artemio Vázquez A. por apoyarme e impulsarme en todo momento, sobre todo por ser, ambos, un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos por alentarme en cada oportunidad y por representar una unidad familiar incomparable.

A mi suegra Martha Concepción León R. por todo su apoyo en los momento de mayor necesidad.

A mis compañeros de laboratorio: Ariana, Humberto, Benjamín y Christian, personas que de una u otra manera colaboraron en esta investigación.

A Anabel, Pilar, Ismael y Jesús por brindarme su amistad y compartir agradables momentos.

A todas aquellas personas que voluntaria pero sobre todo de forma involuntaria fueron involucradas en la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

Con mucho cariño:

A mi esposo **Manuel Jesús Zavala León**, quien me brindó su confianza, paciencia y comprensión durante todo el tiempo empleado para hacer posible esta meta profesional. Por estar siempre dispuesto a darme su apoyo y orientación incondicionalmente.

A mis hijos **Yuliana** y **Manuel Joaquín** por ser lo más grande y valioso que Dios me ha regalado, quienes serán siempre mi fuente de inspiración y la razón que me impulsa a salir adelante.

Los amo...

INDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ANEXOS	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I	5
I.1. INTRODUCCIÓN.....	5
I.2. ASPECTOS IMPORTANTES DE <i>Carica papaya</i> L.	7
1.2.1. Características de la planta	7
1.2.2. Clasificación de flores	7
1.2.3. Tipo de flor y tipo de fruto.....	8
1.2.4. Polinización y segregación del sexo	9
1.2.5. Aspectos genéticos de <i>Carica papaya</i> L.....	10
I.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	10
1.3.1. Marcadores morfológicos.....	10
I.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	11
1.4.1. Marcadores moleculares	12
I.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE <i>Carica papaya</i> L.	13
1.5.1. Selección convencional.....	14
1.5.2. Selección asistida por marcadores (MAS)	14
I.6. LOCI DE CARÁCTER CUANTITATIVO (QTL).....	15
1.6.1. Mapeo de QTL	15
1.6.2. QTL en <i>Carica papaya</i> L.	16
1.6.3. QTL en otras especies	17
I.7. OBJETIVOS	18
1.7.1. Objetivo General.	18
1.7.2. Obejtivos Particulares	18
I.8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
I.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

Capítulo II	25
Caracterización morfológica de los caracteres asociados al tipo sexual, color de pulpa y tamaño del fruto de <i>Carica papaya</i> L. var. Maradol en parentales Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial) y su progenie la F1 y F2.	
II.1. INTRODUCCIÓN.....	25
II.2. HIPOTESIS.....	26
II.3. OBJETIVOS	26
II.3.1. Objetivo general.	26
II.3.2. Obejtivos particulares	26
II.4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
II.4.1. Condiciones experimentales	27
II.4.2. Obtención de material vegetal.....	27
II.4.3. Variables evaluadas	29
II.4.4. Análisis estadístico.....	31
II.5. RESULTADOS	32
II.6. DISCUSIÓN.....	41
II.7. CONCLUSIONES	44
II.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
Capítulo III	47
Caracterización molecular del material parental Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial) y progenie F1 yF2 mediante marcadores moleculares 'QTLs' asociados al tipo sexual de flor, color de pulpa y tamaño del fruto en <i>Carica papaya</i> L.	
III.1. INTRODUCCIÓN.....	47
III.2. HIPOTESIS.....	49
III.3. OBJETIVOS	49
III.3.1. Objetivo general.	49
III.3.2. Obejtivos particulares	49
III.4. MATERIALES Y MÉTODOS	50
III.4.1. Material vegetal	50
III.4.2. Extracción de DNA	51
III.4.3. Cuantificación de DNA.....	52
III.4.4. Determinación de calidad de DNA	53
III.4.5. Amplificación mediante PCR.....	53

III.4.6. Electroforesis de producto PCR	55
III.5. RESULTADOS	56
III.6. DISCUSIÓN	77
III.7. CONCLUSIONES	80
III.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
Capítulo IV	85
Evaluación agro-morfológica y obtención de la huella genética mediante AFLP en <i>Carica papaya</i> L. var. Maradol en parentales Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial) y su progenie F1.	
IV.1. INTRODUCCIÓN.....	85
IV.2. HIPÓTESIS.	87
IV.3. OBJETIVOS.....	87
IV.3.1. Objetivo general.	87
IV.3.2. Objetivos particulares	87
IV.4. MATERIALES Y MÉTODOS	88
IV.4.1. Material vegetal.....	88
IV.4.2. Variables morfológicas evaluadas	88
IV.4.3. Extracción de DNA.....	88
IV.4.4. Digestión de DNA.....	88
IV.4.5. Ligación de adaptadores	89
IV.4.6. Preamplificación selectiva o amplificación preselección	89
IV.4.7. Amplificación selectiva	90
IV.4.8. Detección automatizada de AFLP.....	90
IV.5. RESULTADOS.....	91
IV.5.1. Análisis agro-morfológico.....	91
IV.5.2. Análisis molecular con AFLP.....	94
IV.6. DISCUSIÓN	102
IV.7. CONCLUSIONES.....	105
IV.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

Capítulo V	109
V.1. DISCUSIÓN GENERAL	109
V.2. CONCLUSIÓN GENERAL	112
V.3. PERSPECTIVAS	113
V.4. REFERENCIAS	114

LISTADO DE ABREVIATURAS

MAS/SAM = Marker assisted selection (Selección Asistida por Marcadores Moleculares)

QTL= Quantitative Trait Loci (Loci de carácter cuantitativo)

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción)

RAPD= Random Amplification of Polymorphic DNA (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico)

DAF= DNA Amplification Fingerprinting (Amplificación de huella genética de ADN)

AP-PCR= Arbitrary Primer PCR (PCR con oligonucleótidos arbitrarios)

SSR= Simple Sequence Repeats (Secuencia Simple Repetida o microsatélite)

SCAR= Sequence Characterized Amplified Region (Región Amplificada Caracterizada y Secuenciadas)

CAPS= Cleavage Amplified Polymorphic Sequence (Secuencia polimórfica amplificada y cortada)

ISSR= Inter Simple Sequence Repeats (Inter Secuencias Simples Repetidas)

AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)

EST= Expressed Sequence Tags (Sitios etiquetados por la expresión)

SNP= Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de nucleótido único)

cM=Centimorgan

BAC= Bacterial artificial chromosome (Cromosomas Bacterianos Artificiales)

F1, F2= Progenie Filial 1 y 2

Tris= tri-hydroxymethyl amino methane (tri-hidroximetil amino metano)

L7= Criolla Línea 7

M22= Maradol 22

EDTA= Ethylene diamine tetraacetic acid (ácido etilendiamino tetraacético)

BSA = Bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)

dNTP = desoxinucleótido trifosfato

bp = base pairs (pares de bases)

PCR = Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

Taq pol= *Thermus aquaticus* polymerase (Polimerasa de *Thermus aquaticus*)

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Tipos de plantas de acuerdo al sexo de las flores que produce <i>Carica papaya</i> L. a: flor femenina, b: flor masculina, c: flor hermafrodita... ..	8
Figura 1. 2. Diagrama de la estrategia experimental general.	19
Figura 2.1. a) Esquema de la obtención de material vegetal criollo útil para la cruce intraespecífica y mejoramiento genético de <i>Carica papaya</i> L. b) Planta madres de Criolla Línea criolla 7 generada a partir del fruto colectado en Cancún, Quintana Roo.	28
Figura 2.2. Colección de plantas de papaya 'Maradol' establecida en condiciones de invernadero como fuente de producción de polen	28
Figura 2.3. Diagrama de dispersión tipo Biplot de progenie F1 (a) y F2 (b) proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 de <i>Carica papaya</i> L. basado en componentes 1 y 2.....	37
Figura 2.4. Dendograma de conglomerados basado en distancias euclideas al cuadrado obtenido con el método Ward's para caracteres evaluados en los frutos de 28 genotipos F1 y 26 genotipos F2 proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 de <i>Carica papaya</i> L.....	39
Figura 3.1. Parentales L7 y M22, papaya Criolla Línea 7 (a) y Maradol 22 (b), con caracteres contrastantes en la morfología del fruto.....	50
Figura 3.2. Electroforesis del DNA extraído de parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 (a) y F2 (b, c, d) provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22.	56
Figura 3.3. Marcador molecular de sexo CPM1815YC2 (a) amplificado en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22 y dos plantas femeninas de <i>Carica papaya</i> L. (Fcam y F5). Marcador molecular de color de pulpa CPFC1 (b) amplificado en los parentales L7 y M22, Fcam, y H6B, H7B, H9B, H10B.	58
Figura 3.4. Electroforesis del marcador de sexo amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F1 proveniente de la cruce intraespecífica L7x M22) de <i>Carica papaya</i> L.....	59
Figura 3.5. Electroforesis del marcador molecular de sexo amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F2 provenientes de H90B, H77B y H70B en <i>Carica papaya</i> L.....	60

Figura 3.6. Electroforesis del marcador molecular de color de pulpa amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F1 proveniente de la cruza L7xM22 de <i>Carica papaya</i> L.....	62
Figura 3.7. Electroforesis del marcador molecular de color amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F2 provenientes de autopolinizaciones de H90B, H77B y H70B en <i>Carica papaya</i> L... ..	63
Figura 3.8. Programa de Tm para la prueba de gradientes de temperatura (a) y grupos formados por QTLs que comparten la misma Tm de alineamiento en PCR (b).....	65
Figura 3.9. Electroforesis de los marcadores moleculares QTLs asociados a la morfología del fruto amplificados en parentales Criolla L7 y Maradol 22 de <i>Carica papaya</i> L. a: QTLs peso de fruto, b: QTLs longitud de fruto, c:QTLs diámetro de fruto, d: QTLs forma de fruto.....	66
Figura 3.10. Electroforesis de los marcadores moleculares QTLs polimorficos seleccionados y asociados a la morfología del fruto amplificados en parentales Criolla L7 y Maradol 22 de <i>Carica papaya</i> L.....	67
Figura 3.11. Electroforesis de los marcadores moleculares QTLs asociados a la morfología del fruto amplificados en parentales Criolla L7 y Maradol 22 de <i>Carica papaya</i> L. y su progenie F1 (a) y F2 (b).....	68
Figura 3.12. Comparación de las características morfológicas de longitud (a), peso (b) y diámetro de fruto (c) en la progenie F1 proveniente de la cruza intraespecífica Criolla Línea 7x Maradol 22 de <i>Carica papaya</i> L.....	74
Figura 3.13. Comparación de las características morfológicas de longitud (a), peso (b) y diámetro de fruto (c) en la progenie F2 en la progenie F2 proveniente de autopolinizaciones de genotipos H90B, H77B y H70B de <i>Carica papaya</i> L.....	75
Figura 3.14. Morfología de la forma de fruto en progenie F1 y F2 provenientes de la cruza Criolla Línea 7 x Maradol 22.....	76
Figura 4.1. Dendograma de parentales L7, M22 y progenie F1 de papaya obtenido de 32 caracteres morfológicos basado en el método Ward y distancias euclídeas al cuadrado.....	93
Figura 4.2. Distribución de datos obtenidos mediante comparación por pares de la similitud genética entre 45 genotipos de <i>Carica papaya</i> L.....	95

Figura 4.3. Electroferogramas obtenidos con las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP (E-ACA/M-CTA (a), E-ACT/M-CGA (b), E-ACT/M-CTT (c), E-ACC/M-CTA (d) en parentales Línea 7 (Criolla) (L7), Maradol 22 (Comercial) (M22) y genotipos F1..... 96

Figura 4.4. Dendograma generado por el método UPGMA, usando el coeficiente de similitud de DICE, a partir de los patrones de fragmentos generados por cuatro pares de iniciadores de AFLPs en 45 genotipos de *Carica papaya* L..... 99

Figura 4.5. Gráfico biplot estimado con 217 marcadores AFLP usando la matriz de similitud de DICE para 45 genotipos de *Carica papaya* L..... 101

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. 2. Proporciones de la segregación del sexo en <i>Carica papaya</i> L. de acuerdo al sexo de los individuos usados en diferentes cruzas.	9
Cuadro 1. 2. Comparación de ventajas y desventajas de una caracterización mediante marcadores morfológicos.	11
Cuadro 1. 3. Características importantes de marcadores moleculares de DNA.	13
Cuadro 2.1. Comparación del número de individuos segregantes según el carácter de sexo en la población F1 y F2 generada a partir la cruce intraespecífica de <i>Carica papaya</i> L. Criolla Línea 7 x Maradol 22... ..	32
Cuadro 2.2. Proporción de la varianza total, vectores y valores propios de los primeros tres componentes principales analizados en 28 genotipos F1 y 26 genotipos F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 de <i>Carica papaya</i> L... ..	35
Cuadro 2.3. Valores medios de caracteres evaluados en el fruto por grupo formado mediante el análisis de agrupamiento en población F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica de <i>Carica papaya</i> L. entre Criolla Línea 7 x Maradol 22... ..	40
Cuadro 3.1. Características de los parentales contrastantes empleados para generar la población F1 y F2 de <i>Carica papaya</i> L... ..	51
Cuadro 3.2. Iniciadores de marcadores moleculares de DNA 'QTLs' usados en la amplificación por PCR asociados a caracteres caracteres del tipo sexual de flor y morfológicos del fruto en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22... ..	54
Cuadro 3.3. Programa utilizado en el termociclador para la amplificación de marcadores moleculares de DNA 'QTLs' asociados a caracteres caracteres del tipo sexual de flor y morfológicos del fruto en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22... ..	55
Cuadro 3.4. Tamaño de fragmento esperado para 11 marcadores moleculares QTL asociados a caracteres morfológicos del fruto obtenidos mediante perfectBlast.	64
Cuadro 4.9. Similaridad genética de parentales y progenie F1 proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 de <i>Carica papaya</i> L. basada en el coeficiente Simple Matching y obtenida con 32 caracteres morfológicos.... ..	92

Cuadro 4.10. Combinaciones de iniciadores usados en la obtención de huella genética y distribución de fragmentos totales, monomórficos y polimórficos en parentales y progenie F1 proveniente de L7xM22 de *Carica papaya* L... 95

Cuadro 4.11. Similitud genética de parentales L7, M22 y progenie F1 proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L. basada en el coeficiente DICE y obtenida con marcadores AFLP... 98

ANEXOS

I Cuadro 3.5. Datos de la salida generada por el programa bioinformático perfectBlast, útiles para el cálculo *in silico* del tamaño de fragmento esperado de marcadores de DNA 'QTLs' asociados a la morfología de flor y fruto en *Carica papaya* L... 116

II Cuadro 4.1. Nombres descriptivos de 32 caracteres morfológicos evaluados y propuestos por UPOV. . 127

III Cuadro 4.2. Mezcla de reacción de la digestión del ADN. . 128

IV Cuadro 4.3. Mezcla de reacción de la digestión/ligación. 128

V Cuadro 4.4. Mezcla de reacción para la preamplificación de la digestión/ligación..... 129

VI Cuadro 4.5. Procedimiento del programa de preamplificación.. 129

VII Cuadro 4.6. Mezcla de reacción para amplificación selectiva..... 130

VIII Cuadro 4.7. Procedimiento del programa de amplificación selectiva toch down..... 130

IX Cuadro 4.8. Mezcla de reacción para el marcador de peso molecular.. 131

RESUMEN

Se caracterizaron morfológicamente 13 caracteres de los frutos de parentales L7, M22 y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce L7xM22. Dichos resultados fueron comparados con los obtenidos molecularmente mediante marcadores de ADN 'QTL' asociados a caracteres morfológicos de sexo de la flor y fruto de papaya. El objetivo fue validar su uso en la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) e implementarlos en el programa de mejoramiento de papaya iniciado en el CICY.

Los marcadores moleculares CPM1815CY2 y CPFC1 (sexo y color, respectivamente) por su carácter monogénico, pueden ser incluidos en un programa de mejoramiento asistido por marcadores (SAM). El marcador CPM1815CY2 logró separar plantas hermafroditas y femeninas en estado de plántula en una proporción esperada 2:1 y confirmada morfológicamente 2 meses después cuando las plantas estaban en la etapa de floración. En relación al marcador CPFC1, este fue capaz de separar genotipos con pulpa naranja-rojiza de frutos amarillos y nuevamente fueron validados cuando las plantas produjeron frutos hasta los 8 meses después del trasplante.

Estos estudios se completaron con la caracterización molecular mediante AFLP de los parentales L7, M22 y su progenie F1. Dicha caracterización se comparó con la caracterización morfológica de 32 caracteres evaluados. Las combinaciones de iniciadores que mayor polimorfismo mostraron fueron E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CTA, E-ACT/M-CGA.

Los resultados de la presente tesis deben servir de base para la búsqueda futura de nuevos QTL en papaya, asociados a algún carácter fenotípico de interés que pudiera estar asociados a mayor tolerancia a estreses biótico o abiótico, o a un mayor contenido nutrimental o nutraceútico de plantas y frutos de papaya.

ABSTRACT

The *Carica papaya* L. parentals L7 (landrace) and M22 (comercial), as well as the F1 and F2 progenies resulting from the intraspecific crossing L7XM22, were morphologically characterized using 13 UPOV parameters. The resulting morphological grouping was compared with a molecular characterization using DNA markers 'QTL' associated with morphological characters of flower and fruit.

The ultimate aim was to validate the use of molecular markers assisted selection (MAS), to improve our ongoing papaya breeding program. The molecular markers CPM1815CY2 (sex type) and CPFC1 (pulp color of fruits) proved useful for being included in a future mas program for papaya breeding.

The marker CPM1815CY2 correctly separated hermaphrodite from female plants at early stages (two weeks old seedlings) in an expected proportion (2:1). The validity of the marker was later confirmed morphologically, when plants produced flowers (2 months later). on the other hand, the marker CPFC1 was capable to identify genotypes with orange-red pulp in their fruits, what was again later confirmed when those plants beared fruits (8 months later).

These studies were completed with the molecular characterization of the parentals and their progeny now using AFLP_s. The primers combinations that showed higher polymorphisms were E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CTA, E-ACT/M-CGA.

The results from the present thesis should serve as a platform to future projects seeking the identification of new QTL associated with traits related to increased biotic or abiotic stress tolerance, or increased nutraceutical or nutrimental content of papaya plants and fruits.

CAPITULO I

I.1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un frutal tropical que tiene su origen en América Central, probablemente al sur de México, de donde se ha extendido por todos los países tropicales, cultivándose desde tiempo inmemoriales en toda la zona citada, las Antillas, Brasil, África Tropical y Norteamérica, actualmente se distribuye en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Mishra *et al.*, 2007).

Este cultivo ha tenido una creciente demanda principalmente en el mercado de EE.UU. y Canadá; México ha sido el principal proveedor con una producción nacional para el 2009 de hasta 919, 425 toneladas en una superficie total cosechada de 20, 946 hectáreas, con un rendimiento de 43.9 ton/ha, mientras que para el estado de Yucatán se reporta una producción estatal de 31, 406 toneladas en una superficie total cosechada de 646 hectáreas, con un rendimiento de 48.6 ton/ha (FAOSTAT, 2009; SIAP, 2009).

Posee un fruto con alto valor nutricional basado en alto contenido de vitaminas A, B y C, además, favorece la digestión y asimilación de los alimentos. Presenta un amplio rango en tamaño y forma del fruto, según la variedad y nivel de maduración. Cabe mencionar que la forma del fruto está ligada al sexo de la planta de tal manera que el fruto hermafrodita generalmente tiene forma elongada o de pera y el fruto femenino es uniformemente ovoide o esférico. Aunado a esto la preferencia del consumidor según el color del fruto, tamaño y forma varía ampliamente por región, sin embargo se considera que la papaya Hawaiana 'Solo' tiene la más alta calidad y consumo del mercado fresco en el mundo, cuyas características son: pulpa amarilla, fruto pequeño y en forma de pera, adecuado para una persona (Morton, 1987), No obstante, la papaya 'Maradol' también tiene mercado definido en Reino Unido, Holanda, Alemania, Francia y España concentrando el 81% del volumen total importado por la Unión Europea (SAGARPA, 2005).

Algunas características del fruto tales como color, forma y sabor han sido de particular interés en el mejoramiento genético de papaya, no obstante, la mayoría de los materiales comerciales presentan alta susceptibilidad a enfermedades (antracnosis y virus de la mancha anular), escasa resistencia a factores abióticos (sequía), además, pérdida gradual

de caracteres deseables del fruto (p.e. var. Maradol), por lo tanto, reducción en la calidad del mismo. En contraparte, los materiales criollos de papaya (p.e. *Chi'ch'put*) desarrollan frutos pequeños y presentan una considerable resistencia a estrés hídrico (Fernando Contreras, comunicación personal).

Al respecto, la selección convencional es principalmente utilizada en la obtención de materiales mejorados que conjugan las características deseadas (Márquez, 1992), sin embargo, este tipo de selección requiere de periodos prolongados de tiempo (aproximadamente 15 años). Actualmente se puede emplear la Selección Asistida por Marcadores Moleculares "MAS" (por sus siglas en inglés Marker Assisted Selection) mediante la cual se pueden detectar asociaciones entre la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN denominados QTLs (Quantitative Trait Loci) que indican el lugar en el genoma de uno o varios genes que afectan a un determinado carácter (Rocha *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Valadéz y Kahl, 2000). Así, la biotecnología permite seleccionar a individuos portadores de marcadores asociados a un carácter de interés.

La disminución de los tiempos y costos de manejo del cultivo son algunas de las ventajas que presentan sobre los programas tradicionales de mejora genética vegetal (Posada, 2005). Al respecto, (Blas, 2008), reportó 13 QTLs que identificaron genes asociados con peso, diámetro, longitud y forma del fruto, además especificó que el tamaño y forma del fruto son controlados por múltiples genes, y el color de la pulpa por un solo gen. Mientras que (Chen *et al.*, 2007) reportaron un QTL asociado a la identificación del sexo de *Carica papaya* L., el cual está ligado con la forma alargada del fruto, característica de mayor preferencia comercial.

En esta investigación se pretende validar marcadores QTL asociados a caracteres morfológicos del fruto de *Carica papaya* L. los cuáles serán empleado en la SAM para la obtención de un material de *Carica papaya* L. cv Maradol, con características de tamaño pequeño, forma elongada y color de pulpa naranja rojizo; dada su importancia económica y la necesidad de mejorar la producción de papaya (tanto en cantidad como en calidad de fruto) surge el interés sobre aquellos materiales que cumplan con características de tamaño pequeño y que además provengan de flores hermafroditas, los cuales pueden ser sometidos a selección mediante el análisis de marcadores moleculares para detectar QTL de interés y posteriormente emplearlos para el mejoramiento genético del cultivo.

ANTECEDENTES

I.2. ASPECTOS IMPORTANTES DE *Carica papaya* L.

1.2.1. Características de la planta

La papaya es una planta dicotiledónea y se incluye actualmente en la familia *Caricaceae* (Chan, 2009; Chen *et al.*, 2007; Eustice *et al.*, 2008). Este género contiene alrededor de 34 especies, pero sólo tres son de importancia hortofrutícola; *C. papaya*, *C. candamarcensis* (papaya de montaña) y *C. monoica* (Antunes y Renner, 2012; Ibar, 1986).

Las plantas cultivadas de *Carica papaya* L. se clasifican en hermafroditas, femeninas y masculinas, genotipos denominados también como andromonoica, ginoica y androica, respectivamente (Ramos *et al.*, 2011; Filho *et al.*, 2007), de las cuales derivan poblaciones distinguidas como: dioica (plantas con flores femenina y plantas con flores masculinas), ginoandromonoica o ginodioica (plantas con flores femeninas y plantas con flores hermafroditas), y trioica (plantas femeninas, plantas hermafroditas y plantas masculinas) (Oliveira *et al.*, 2010a; Yu *et al.*, 2008; Filho *et al.*, 2007; Jiménez, 2002).

1.2.2. Clasificación de flores

En esta especie se reconocen seis tipos bien diferenciados de flores (Figura 1.1): uno femenino, tres hermafroditas y dos masculinos, designados comúnmente como los tipos I, II, III, IV, IV+ y V, respectivamente (Parés *et al.*, 2004).

Las flores hermafroditas se distinguen por el número y distribución de los estambres, forma de ovario y características de la corola; estas flores también se les denomina "pentandria" (tipo II), "irregular" (tipo III) y "elongata" (tipo IV); las flores de tipo III y en menor grado las del tipo II presentan carpeloidía de estambres. Las flores masculinas pueden ser "funcional masculina" (tipo IV+) y "masculina típica" (tipo V); estas flores por lo general no desarrollan frutos. Las diferencias en la biología floral depende de las condiciones ambientales, especialmente sequía y temperaturas altas (Niklas y Marler,



Figura 1.1. Tipos de plantas de acuerdo al sexo de las flores que produce *Carica papaya* L. **a:** flor femenina, **b:** flor masculina, **c:** flor hermafrodita. Fuente: Bogantes y Mora, 2006.

1.2.3. Tipo de flor y tipo de fruto

Se describe esta comparación de la siguiente manera (Jiménez, 2002):

- a. Femenina:** flor con ovario semiesférico funcional, grande y súpero, corola con cinco pétalos libres. Es la más grande de todas y produce frutos oblongos o semiesféricos.
- b. Hermafrodita pentándria:** flor con cinco pétalos y ovario redondo surcado en la base, genera frutos alargados deformes con una especie de relieves al contorno del fruto.
- c. Hermafrodita intermedia:** flor con ovario funcional y número irregular de estambres (6-9), algunos de los cuales tienen adheridos sus filamentos carnosos al ovario en un tercio de su longitud, lo que ocasiona que se produzcan frutos deformes de poco valor comercial, conocidos como carpeloicos o cara de gato.
- d. Hermafrodita elongata:** flor perfecta con ovario funcional alargado y 10 estambres. Sus pétalos están unidos en aproximadamente un tercio de la corola. Producen frutos alargados, cilíndricos o aperados bien formados.
- e. Falsa Hermafrodita o hermafrodita estéril de verano:** similar a la elongata pero con el órgano femenino poco desarrollado y no funcional, aunque en ocasiones produce frutos monocarpelares. Flor de corto racimo, gruesa corola y pistilos no funcionales, se le conoce como flores estériles de verano y su desarrollo se favorece con condiciones de sequía y altas temperaturas. Es una característica poligénica dominante que en algunos individuos causa completa esterilidad y en otros solo en determinadas épocas del año.

f. Masculina: flor pequeña con corola gamopétala delgada que termina en cinco pétalos pequeños. Consta de 10 estambres y un pistilo monocarpelar no funcional. No produce frutos.

1.2.4. Polinización y segregación del sexo

De manera natural la papaya es polinizada por el viento o insectos (polinización cruzada), y las plantas dioicas presentan un alto grado de alogamia (Crane, 2008; Ronse y Smets, 1999; Baraona y Sancho, 1991), sin embargo, es posible realizar la polinización artificial o manual donde se aprovechan flores con estigmas receptivos y próximas a abrir para garantizar que no ha sido contaminada con polen externo.

La segregación del carácter del sexo en papaya presenta diferentes proporciones según los individuos utilizados en la polinización artificial. El sexo de papaya está determinado por herencia monogénica donde participan los alelos M, M^H y m (masculino, hermafrodita y femenina, respectivamente), sin embargo, solo los genotipos Mm, M^Hm y mm son viables. El cálculo de proporciones del genotipo del sexo reportadas por (Chan, 2009) son de utilidad tanto para el productor como para el fitomejorador, dado que si los progenitores de una cruce son conocidos, la relación de plantas productivas respecto a las no productivas se puede estimar (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Proporciones de la segregación del sexo en *Carica papaya* L. según los individuos usados en diferentes cruces.

Polinización	Proporción de la segregación		
	Femenina	Hermafrodita	Masculina
mm*Mm	1	-	1
mm*M ^H	1	1	-
M ^H (autopolinización)	1	2	-
M ^H * M ^H	1	2	-
M ^H *Mm	1	1	1

F: femenina M: masculina H: hermafrodita

1.2.5. Aspectos genéticos de *Carica papaya* L.

La papaya posee en sus células mitóticas $2n=18$ cromosomas los cuales están clasificados como metacéntricos y submetacéntricos (Santos *et al.*, 2010). Además, tiene un genoma relativamente pequeño de 372 megabases (Ming *et al.*, 2008) en el que se han ubicado hasta el momento 24, 746 genes (Moore y Ming, 2008).

La relativa simplicidad del genoma de papaya se hace ideal para el análisis detallado de genes que codifican para proteínas involucradas en procesos fisiológicos y bioquímicos, características anatómicas y morfológicas y su interacción con el medioambiente (Moore y Ming, 2008)

I.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se basa principalmente en la integración, comparación y agrupación de una serie de descriptores de cualquier especie. Un descriptor de una especie o genotipo es un carácter fácil de medir, y que hace referencia a la forma, estructura o funcionamiento de una accesión. Los más utilizados en las plantas son: de pasaporte, morfológicos, fisiológicos y respuesta al ambiente (factores bióticos y abióticos).

Los descriptores morfológicos permiten una discriminación fácil y rápida, que generalmente corresponden a caracteres altamente heredables, pueden observarse a simple vista; además, pueden incluir un número limitado de caracteres deseables para el investigador según la accesión (Franco e Hidalgo, 2003). Los descriptores indican en forma práctica y fácil a cada accesión, ofreciendo con esto una descripción de la población (Querol, 1998). La utilidad de este tipo de caracterización incluye la identificación de materiales duplicados, el análisis de patrones de variación genética y correlación con las características de importancia agronómica (Darjazi, 2011).

1.3.1. Marcadores morfológicos

Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como: forma, color, tamaño, altura etc., útiles en la caracterización e identificación tradicional de variedades (Phipps, 1997). Muchas de ellas se convierten en importantes "descriptores", a la hora del registro de nuevas variedades. Sin embargo, presentan algunas limitaciones; pues su

expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos y solo es posible evaluarlo a nivel de toda la planta y en estado adulto (Azofeifa, 2006), en el Cuadro 1.2 se enlistan las ventajas y desventajas del uso de marcadores morfológicos.

En el mejoramiento genético estos marcadores son de uso limitado (Masuelli, 1999), no obstante permanecen útiles en la identificación de materiales vegetales que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo.

Cuadro 1.2. Comparación de ventajas y desventajas de una caracterización mediante marcadores morfológicos.

Ventajas	Desventajas
Son fáciles de realizar	Deben ser evaluados por un experto
No requiere de equipo sofisticado	Están sujetos a cambios ambientales
Apreciación directa del fenotipo	Varían según etapa de desarrollo

Los descriptores morfológicos específicos para *Carica papaya* L. han sido reportados por la (UPOV, 2010; y por el (IBPGR, 1988) y son frecuentemente utilizados como guía para realizar pruebas de distinción, análisis de homogeneidad y estabilidad en la caracterización de esta especie.

I.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se genera del análisis molecular de la variabilidad del ADN, el cual permite determinar puntos de referencia en los cromosomas técnicamente denominados “marcadores moleculares”. Diversas técnicas de biología molecular están disponibles para la detección de la variabilidad genética a nivel de secuencia de ADN, es decir, para la detección del polimorfismo genético en cualquier población. De tal manera que se puede obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cubriendo todo el genoma del organismo, los cuales pueden ser utilizados para diversas aplicaciones, tanto en estudios genéticos y en aplicaciones prácticas del mejoramiento vegetal (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.4.1 Marcadores moleculares

La información genética de las plantas se encuentra almacenada en la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) de los cromosomas nucleares y en los genomas de los organelos. Las técnicas de la biología molecular y particularmente el uso de marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar genéticamente a los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. Los marcadores moleculares han aportado información relevante en áreas de la conservación *in situ* y *ex situ* (Karp *et al.*, 1997).

Las ventajas de la caracterización utilizando marcadores moleculares (ADN) sobre la caracterización morfológica es que no está influenciada por el ambiente y se puede utilizar parte de la planta en cualquier estado de desarrollo. Además, están aparentemente libres de efectos epistáticos y se pueden evaluar un número ilimitado de ellos.

Los marcadores moleculares o llamados también marcadores de ADN (PIONNER, 2001) funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y entre sus principales características se consideran las siguientes:

- Son fenotípicamente neutros.
- Presentan mayor segregación o polimorfismo que los marcadores morfológicos.
- Pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de plántulas.
- Son aplicables a cualquier tipo de material vegetal.
- Son independientes de la época del año en que se efectúe el análisis.
- Permite la identificación correcta del material vegetal en cuestión.
- Son útiles en el mapeo genético para encontrar la posición e identidad de un gen.
- Permiten evidenciar variaciones (*polimorfismo*) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen o no su fenotipo (señalan tanto regiones codificantes como no-codificantes del genoma).

En el siguiente Cuadro 1.3 se especifican las características más representativas de los marcadores moleculares de uso más frecuente.

Cuadro 1.3. Características importantes de marcadores moleculares de ADN.

M. M	No.	Codominante	Polimorfismo	Específico	Tecnicidad	Costo
Isoenz.	- 90	Si	Bajo	si	Bajo	Bajo
RFLP	Ilim.	Si	Medio	si	Alto	Medio
RAPD	Ilim.	No	Medio	No	Bajo	Bajo
DAF	Ilim.	No	Muy alto	No	Bajo	Bajo
AP-	Ilim.	No	Muy alto	No	Bajo	Bajo
SSR	Ilim.	Si	Muy alto	Si	Bajo*	Bajo*
SCAR	Ilim.	Si/No	Bajo/Medio	Si	Medio	Bajo
CAPS	Ilim.	Si	Bajo/Medio	Si	Medio	Bajo
ISSR	Ilim.	No	Alto	Si	Bajo/ Medio	Bajo/Medio
AFLP	Ilim.	No	Alto	NO	Medio	Medio
EST	Ilim.	Si	Bajo/Medio	Si	Medio	Medio
SNP	Ilim.	Si	Muy alto	Si	Alto	Alto

*Cuando ya se han identificado los SSR y se han diseñado los cebadores. (IPBGR, 2004).

I.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *Carica papaya* L.

En especies alógamas tal como algunas poblaciones de papaya, la selección recurrente (retrocruza) ha sido muy utilizada ya que el proceso de recombinación genética ocurre en forma natural. La selección recurrente es un método de selección en el cual los individuos seleccionados, con base en alguna característica, son inter cruzados para obtener una nueva población que será utilizada en un nuevo ciclo de recombinación. Es un método eficiente para realizar un cambio gradual en las frecuencias génicas de la población, procurando un aumento de las frecuencias de los genes favorables para la expresión de un determinado carácter.

Aunque es considerado como un método bien conocido por la introgresión o sustitución de un alelo de interés, el gran número de generaciones necesarias para recuperar el genoma del padre recurrente y la presencia de porciones del genoma de ambos progenitores relacionados con el alelo favorable trasladado son dos problemas inherentes a la retrocruza (Ramos *et al.*, 2011).

1.5.1. Selección convencional

Estos métodos utilizan la expresión fenotípica como fuente de información de la variabilidad existente, como objetivo y criterio de selección. Se realiza en busca del mejoramiento en las plantas de interés agrícola, de tal manera que el material vegetal que hoy se cultiva es muy distinto de sus ancestros silvestres, ya que el hombre ha modificado y seleccionado aquellas propiedades y características deseables en función de sus necesidades a través del tiempo (Márquez, 1992).

Se le conoce como selección artificial ya que es el hombre el que interviene en la selección de plantas con el fin de adaptarlas a un ambiente propio (distinto al natural). Este proceso se ha desarrollado sobre caracteres observables (fenotipo), sin embargo, no solo abarca caracteres morfológicos o fisiológicos, sino también aquellos que afectan la composición química del producto cosechado (Fuentes, 2001).

Al respecto, (Bogantes y Mora, 2006) reportan que con el objetivo de producir variedades estables, homogéneas con buen rendimiento y sabor en *Carica papaya* L., se realizó el mejoramiento genético convencional para generar el híbrido comercial Poccocí. El proceso inició con la estabilización de poblaciones de alta variabilidad hasta obtener líneas puras que posteriormente se cruzaron para generar el híbrido, el tiempo requerido fue de aproximadamente 7 años, pero puede ser hasta de 12 años como lo reportan (Oliveira *et al.*, 2010b).

1.5.2. Selección asistida por marcadores moleculares (MAS)

Es una estrategia que integra la información provista por marcadores moleculares a los criterios clásicos de selección, es decir, se basa en la identificación de marcadores moleculares asociados a loci que codifican tanto para características cualitativas como para características cuantitativas (QTL) con la posibilidad de realizar selección asistida por marcadores.

Esta se basa en: a) conjugar la variabilidad fenotípica y genotípica como fuente de información de la variabilidad existente, b) utilizar como criterio de selección una variable genética, en este caso marcadores moleculares asociados a la característica de interés.

Se validaron marcadores tipo SCAR y RAPD con búsqueda de utilidad en la selección de genotipos de acuerdo al sexo de la planta; de los cuales el marcador RAPD BC210 predijo correctamente a las plantas femeninas y hermafroditas mostrando gran potencial para la SAM basado en este carácter (Oliveira *et al.*, 2007).

1.6. LOCI DE CARÁCTER CUANTITATIVO (QTL)

Al loci de uno o varios genes que afecta un carácter cuantitativo se le denomina en inglés "quantitative trait loci" y se le conoce por la sigla QTL. Un QTL se basa en la presencia de loci de gran importancia relacionado con la expresión de características cuantitativas (Rocha *et al.*, 2007).

1.6.1. Mapeo de QTL

El uso de mapas genéticos de marcadores moleculares para el estudio de la herencia de características cuantitativas, permite la identificación de cromosomas (o grupos de ligación) los cuales son importantes para determinar la expresión de un carácter. Para el mapeo de características cuantitativas, la selección de progenitores se basa en la utilización de padres fenotípicamente contrastantes para las características de interés, buscando maximizar los efectos de las sustituciones alélicas en los loci asociados a caracteres cuantitativos para que puedan ser detectados.

Los programas de mejoramiento genético consideran la selección de plantas basado en diversas características de interés agronómico y por lo tanto económico. En este sentido el mapeo de QTLs usualmente considera un análisis del tipo univariado, de un carácter. Sin embargo, actualmente se dispone de una importante base estadística genómica que permite el mapeo simultáneo del QTL para características medidas repetidamente en el tiempo. El análisis multivariado se puede aplicar cuando varias características son medidas en un mismo individuo.

En el caso de características que son medidas repetidamente en un mismo individuo a través del tiempo, el estudio se extiende a un análisis longitudinal (longitudinal traits). Existen tres posibles métodos disponibles para el análisis de características longitudinales (Yang *et al.*, 2006). El primer método trata los valores fenotípicos obtenidos en diferentes tiempos, como medidas repetidas de la misma característica y analiza la característica según el concepto de medidas repetidas. El segundo método trata los fenotipos, medidos en diferentes tiempos, como diferentes características y los analiza en función de la teoría de análisis multivariado (Wu *et al.*, 1999). El tercer método consiste en ajustar los valores fenotípicos a una curva de crecimiento, para los diferentes puntos en el tiempo, y analiza los parámetros ajustados según la teoría de análisis multivariado (Wu *et al.*, 2002).

En *Carica papaya* L. (Chen *et al.*, 2007) reportaron la construcción de un mapa de alta densidad con 707 SRR, se generaron nueve grupos de ligamiento mayores que conformaron 1069.9 cM y una distancia de 1.5 cM entre marcadores. Por su parte, (Ma *et al.*, 2004) construyeron el mapa genético con 1498 AFLP y generaron 12 grupos de ligamiento conformado con 3242.2 cM y una distancia de 2.2 cM. Además, (Yu *et al.*, 2009) construyeron un mapa físico basado en BAC y fue integrado con un mapa genético, para facilitar la secuenciación del genoma de papaya. Esta integración es un recurso valioso para la genómica comparativa y la ubicación y clonación de genes agrónomicamente y económicamente importantes, además, para la investigación de los cromosomas sexuales de papaya.

Los trabajos antes mencionados han dado pie para la exploración de marcadores moleculares que pueden ser usados en la selección asistida por marcadores entre ellos se reporta el marcador SSR "CPM1815YC2", el cual cosegrega en condición de codominancia para plantas de sexo hermafroditas y como homocigoto recesivo para plantas femeninas (Chen *et al.*, 2007). Por su parte (Blas *et al.*, 2010) reportó un marcador tipo SCAR "CPFC1" para la identificación de materiales de papaya con pulpa color roja y color amarilla.

1.6.2. QTL en *Carica papaya* L.

Se determinó las bases genéticas de biosíntesis de carotenoides y su acumulación en el fruto de papaya, además identificó QTLs de forma, diámetro, longitud y peso del fruto,

propuestos para el mejoramiento genético de líneas específicas de papaya y encontró que el tamaño y forma del fruto está controlado por genes múltiples mientras que el color de la pulpa por un solo gen, se identificaron 13 marcadores QTLs involucrados con los genes que codifican para peso, diámetro, longitud y forma del fruto (Blas, 2008).

Se detectó QTLs de características de importancia económicas basado en marcadores AFLP entre las que determinó que el marcador M1527AKF cosegrega para el carácter color de pulpa, mientras que los marcadores M2104EK5 y MO832AK2 para el carácter de entrenudos que participan en la conversión floral (Rajeswari, 2004). Y (Suresh, 1994) mediante marcadores RAPD caracterizó QTLs que afectan la carpeloidia y vigor de la planta, además la tolerancia al virus de la mancha anular. El análisis de QTL indicó que las características de vigor, carpeloidia y tamaño de fruto están influenciadas por múltiples QTL.

1.6.3 QTL en otras especies

Se identificaron QTLs asociados al color naranja de melón en mapas genéticos de ambos parentales cruzados en donde se encontraron involucrados tres marcadores dominantes y uno codominante en el grupo de ligamiento LG6 del parental EC1 de pulpa blanca y en el grupo ligamiento LG3 del parental SWCC9 de pulpa color naranja. En donde se encuentran regiones que contienen el QTL asociado al color naranja del mesocarpo y endocarpo del melón (Song *et al.*, 2010). Y (Yuan *et al.*, 2008) reportaron a los marcadores CSWCT25, CS30, CMBR41 y CS08 tipo SCAR derivados de RAPD están estrechamente vinculadas con algunos QTLs para el peso del fruto, la longitud del fruto, el espesor de la pulpa y el sexo, que puede ser usado para el futuro selección asistida por marcadores para mejorar los rasgos de fruta en pepino. Además se analizaron marcadores RFLP asociados con la forma del fruto de *Lycopersicon sculentum* L. Los marcadores TG537, TG337 y TG645 se denominan QTLs dado que están asociados a la forma del fruto de tomate que se ubican en el cromosoma 2 (Talbot *et al.*, 2007).

I.7. OBJETIVOS

1.7.1. General

Validar QTLs asociados al tipo sexual de flor y a la morfología del fruto de papaya, así como desarrollar las bases del proceso de selección mediante marcadores moleculares (SAM), y la obtener la huella genética con marcadores AFLPs dentro del proceso del mejoramiento genético de *Carica papaya* L. var. Maradol.

1.7.2. Particulares

Caracterizar morfológicamente los caracteres asociados al tipo sexual de flor y fruto de *Carica papaya* L. var. Maradol en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, progenie F1 y F2.

Caracterizar molecularmente el material parental Criolla Línea 7, Maradol 22, progenie F1 y F2 mediante marcadores moleculares (QTL) asociados a características morfológicas del tipo sexual de flor y fruto en *Carica papaya* L.

Seleccionar la progenie F1 y F2 mediante marcadores moleculares (QTLs) y su caracterización agro-morfológica como material genético de interés para obtener una nueva variedad con mejora en el aspecto morfológico del fruto.

Evaluar la variabilidad genética de *Carica papaya* L. presente en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22 y en su progenie F1 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 mediante marcadores morfológicos y moleculares tipo AFLP.

I.8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

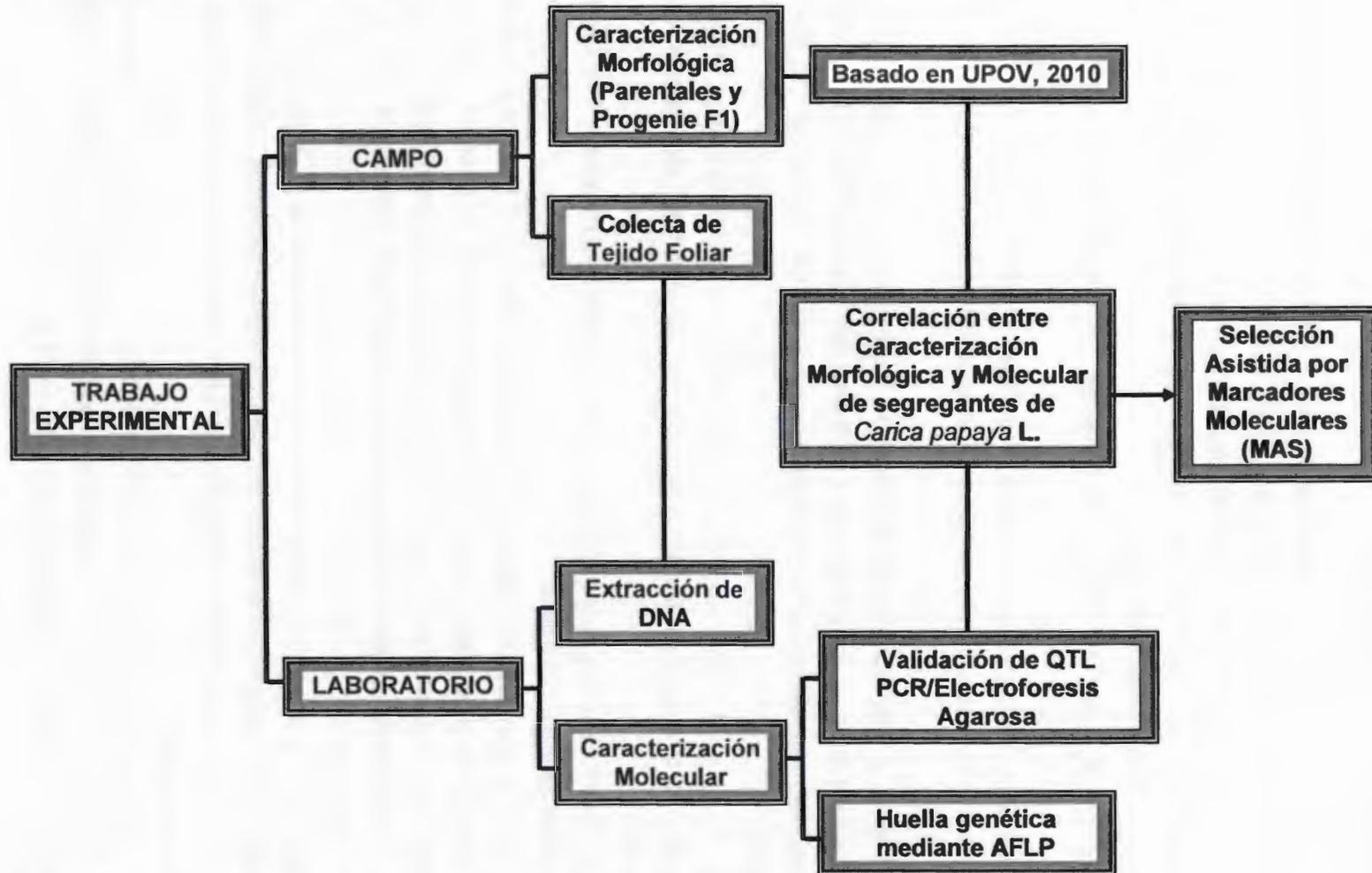


Figura 1.2. Diagrama de la estrategia experimental general seguido en esta tesis.

I.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azofeifa, D.A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Antunes, C. F. y S. S. Renner (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular phylogenetics and evolution*, 65, 46-53.
- Baraona, C. M. y B. E. Sancho (1991). Piña y papaya. *Fruticultura especial II*. San José, Costarrica. EUNED, 76 p.
- Blas, A. L. (2008). Molecular genetic basis of papaya fruit traits. Thesis in doctor of philosophy in molecular biosciences and bioengineering. University of Hawaii. 185 p.
- Blas, A., R. Ming, Z. Liu, O.J. Veatch, E. Robert, H. Paull y Q. Yu (2010). Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene β -Cyclase, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination Hot Spot. *Plant Physiology*, 152, 2013-2022.
- Bogantes, A., y E. Mora (2006). Validación del rendimiento del híbrido de papaya "Pococi" (*Carica papaya*) en el Caribe de Costa Rica. *Revista Alcances Tecnológicos*, 4(1), 53-58.
- Chan, Y. K. (2009). Breeding papaya (*Carica papaya* L.). *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, 121-159 p.
- Chen, C., Q. Yu, S. Hou, Y. Li, M. Eustice, R. L. Skelton, O. Veatch, R. E. Herdes, L. Diebold, J. Saw, Y. Feng, W. Qian, L. Bynum, L. Wang, P. Moore, R. E. Paull, M. Alam y R. Ming (2007). Construction of a sequence tagged high density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in brassicales. *Genetics*, 177, 2481-2491.
- Darjazi, B. B. (2011). Morphological and pomological characteristics of (*Ficus carica* L.) cultivars from Varamin, Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10 (82), 19096-19105.
- Crane, J. H. (2008). Papaya Growing in the Florida Home Landscape. University of Florida. IFAS Extensión. 7 p.
- Eustice, M., Q. Yu, Ch. Wan Lai, S. Hou, J. Thimmpuram, L. Liu, M. Alam, P. H. Moore, G. G. Presting y R. Ming (2008). Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. *Tree genetics and genome*, 4, 333-341.

- FAOSTAT, (2007). Estadísticas de producción y consume mundial de frutas y hortalizas. http://fao.org/statistical_databases, (Acceso 10 diciembre 2009).
- Ferreira, M. E., y D. Grattapaglia (1998). Introducción al uso de los marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa. Brasília, Brasil. 220 p.
- Filho, S. F., P. M. Gonzaga, C. W. Ferreira, D. P. Correa, P. T. N. Santana, S. G. Apolinario, R. H. Cancela y G. A. Ferregueti (2007). DNA marker-assisted sex conversion in elite papaya genotype (*Carica papaya* L.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7, 52-58.
- Franco, T. L. y R. Hidalgo (2003). Análisis estadísticos de datos de la caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico No. 8. IPGRI. Cali, Colombia. 89 p.
- Fuentes, Y. J. L. (2001). Iniciación a la Botánica. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. 230 p.
- Ibar, L. (1986). Cultivo del aguacate, chirimoya, mango, papaya. Editorial Aedos. Tercera Edición. Barcelona, España. 9-59 p.
- IBPGR, (1988). Descriptors for papaya. International board for plant genetic resources. FAO, Roma, Italia. 34 p.
- Jiménez, D. J. A. (2002). Manual Práctico para el cultivo de la papaya Hawaiana. EARTH 1ª edición. Costa Rica. 108 p.
- Karp, A., S. Kresovich, K. Bhat, W. Ayad y T. Hodgkin (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies Rome: IPBGR. Technical Bulletin No. 2, International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy. Available at <http://198.93.227.125/publicat/techbull/TB2.pdf>.
- Ma, H., H. M. Paul, Z. Liu, M. S. Kim y R. Ming (2004). High-Density Linkage Mapping Revealed Suppression of Recombination at the Sex Determination Locus in Papaya. *Genetics*, 166, 419-436.
- Márquez, S. F. (1992). Genotecnia vegetal: métodos, teoría y resultados. AGT, EDITOR S.A. 357 p.
- Masueli, R.W. (1999). Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. *Avances en Horticultura*, 4(1), 61-75.
- Ming, R., Y. Feng, Q. Yu, L. A. Dionne, J. H. Saw, P. Senin, B. V. Wang, K. L. T. Lewis, S. L. Salzberg, L. Feng, M. R. Jones y R. L. Skelton (2008). The draft genome of the

- transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452, 991-997.
- Mishra, M., R. Chandra y S. Saxena (2007). Capítulo 19: Papaya. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, 4, 343-351.
- Moore, P. H. y R. Ming (2008). Papaya Genome: A Model for Tropical Fruit Trees and Beyond. *Tropical Plant Biology*, 1, 179-180.
- Morton, J. (1987). Papaya. In: *Fruit of warm climates*. Available at http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/papaya_ars.html. Accessed 19 may. 2011.
- Niklas, K. J., y T. E. Marler (2007). *Carica papaya* (Caricaceae): a case study into the effects of domestication on plant vegetative growth and reproduction. *American Journal of Botany*, 94(6), 999-1002.
- Oliveira, E. J., J. L. L. Dantas, M. S. Castellen, D. S. Lima, H. S. Barbosa y T. B. N. Motta (2007). Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(12), 747-754.
- Oliveira, E. J., O. A. V. Batista, M. E. L. Santiago, C. J. Leles, C. M. Silva, P. J. Gomes y D. J. L. Loyola (2010a). Polymorphism of Microsatellite Markers in Papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(3), 519-530.
- Oliveira, E. J., S. A. Santos, F. M. de Carvalho, S. L. Ferraz, J. L. Costa, V. Batista y D. L. Loyola (2010b). Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. *Euphytica*, 173, 279-287.
- Parés, M. J., J. R. Linarez y M. Arizaleta (2004). Aspectos de la biología floral en lechosa (*Carica papaya* L.) cv. «Cartagena roja», en el estado Lara, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21(2), 116-125.
- Phipps, J. B. (1997). Monograph of northern Mexican crataegus (Rosaceae). *Botanical Misallany 15*. Botanical Research Institute of Texas INC. Texas, USA. 94 p.
- PIONNER, (2001). Using molecular markers in plant genetics research unlocking genetic potential for increased productivity. Iowa, USA. 7 p.
- Posada, P. L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Biotecnología vegetal*, 5, 67-79.
- Querol, L. D. (1998). Recursos genéticos. Aproximación técnica y socioeconómica. Industrial gráfica S.A. Lima, Perú. 219 p.

- Rajeswari, K. S. (2004). Construction of an AFLP linkage map and analysis of QTLs for economic traits in papaya (*Carica papaya* L.). Thesis in doctor of philosophy in Horticulture. University of Hawaii. 174 p.
- Ramos, H. C. C., M.G. Ramos, F.F. Pereira, L. S. A. Silva, F.O. Gonzales, G.A. Pinto, F. de Souza y T. S. N. Pereira (2011). Genetic characterization of papaya plants (*Carica papaya* L.) derived from the first backcross generation. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 393-403.
- Rocha, R.B., E.G.Barros, C.D. Cruz, A.M. Rosado y E.F. de Araujo (2007). Mapping of QTLs related with wood quality and developmental characteristics in hybrids *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Arvore*, 31, 13-24.
- Ronse, D. L. P., y E. F. Smets (1999). The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). *Canadian Journal of Botany*, 77(4), 582-598.
- SAGARPA, (2005). Plan rector sistema nacional papaya. Comité sistema producto papaya, Maradol roja. 46 p.
- Santos, A. F., C. R. Carvalho y C. W. Ronildo (2010). Genome size, base composition and karyotype of *Carica papaya* L. *Nucleus*, 53 (1-2), 25-31.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera), (2009). <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventana.php?idLiga=1150&tipo=1>, (Acceso 22 noviembre 2009).
- Song, H., C. Jinfeng, J. Staub y P. Simon (2010). QTL analyses of orange color and carotenoid content and mapping of carotenoid biosynthesis genes in cucumber (*Cucumis sativus*). *Acta Horticulturae*, 871, 607-614.
- Suresh, N. S. (1994). Construction of a genetic linkage map of papaya and mapping traits of horticultural importance. Thesis in doctor of philosophy in Horticulture. University of Hawaii. 196 p.
- Talbot, B. M., J. B. Mo, A. J. Monforte y E. V. Knaap (2007). Morphological variation in tomato: a comprehensive study of quantitative trait loci controlling fruit shape and development. *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1339-1349.
- UPOV, (2010). International union for the protection of new varieties of plants. Papaya UPOV Code: Caric_pap *Carica papaya* L. 32 p.
- Valadéz, M. E., y G. Kahl (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas: teorías y protocolos. Universidad Autónoma Chapingo. Mundi Prensa. México, D.F. 164 p.

- Wu, W. Y., W. Zhou, D. Li, Y. Mao y Q. Chen (2002). Mapping of quantitative trait loci based on growth models. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 1043-1049.
- Wu, W.R., W. M. Li, D. Z. Tang, H. R. Lu y A. J. Worland (1999). Time-related mapping of quantitative trait loci underlying tiller number in rice. *Genetics*, 151, 297-303.
- Yang, R., Q. Tian y S. Xu (2006). Mapping quantitative trait loci for longitudinal traits in line crosses. *Genetics*, 173, 2339-2356.
- Yuan, X. J., J. S. Pan, R. Cai, Y. Guan, L. Z. Liu, W. W. Zhang, Z. Li, H. L. He, C. Zhang, L. T. Si y L. H. Zhu. Genetic mapping and QTL analysis of fruit and flower related traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines. *Euphytica*, 164(2), 473-491.
- Yu, Q., P. R. Navajas, E. Tong, J. Robertson, P. H. Moore, A. H. Paterson y R. Ming (2008). Recent Origin of Dioecious and Gynodioecious Y Chromosomes in Papaya. *Tropical Plant Biology*, 1(1), 49 -57.
- Yu, Q., E. Tong, R. L. Skelton, J. E. Bowers, M. R. Jones y R. Ming (2009). A physical map of the papaya genome with integrated genetic map and genome sequence. *BMC Genomics*, 10(371), 1-12.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN MORFÓLOGICA DE LOS CARACTERES ASOCIADOS AL TIPO SEXUAL, COLOR DE LA PULPA Y TAMAÑO DEL FRUTO DE *Carica papaya* L. var. MARADOL EN PARENTALES LÍNEA 7 (CRIOLLA), MARADOL 22 (COMERCIAL) Y SU PROGENIE F1 Y F2.

II. 1 INTRODUCCIÓN

Para obtener nuevos y mejores tipos de plantas se debe partir de una población donde existe variación; entendiéndose por variación la tendencia que muestran las plantas a diferenciarse unas de otras. La variación es por lo tanto la base de todo programa de mejoramiento genético.

El aprovechamiento del potencial genético de un recurso depende en gran medida de la disponibilidad de una amplia base genética; así, los materiales de las colecciones de un germoplasma juegan un papel muy importante en la conservación de esa variabilidad genética. El potencial de un banco de germoplasma radica en la caracterización y la documentación de las introducciones que permitan evitar duplicados e identificar accesiones promisorias para procesos de selección y mejoramiento genético (Fisher *et al.*, 2000).

La caracterización fenotípica se ha realizado tradicionalmente mediante el uso de descriptores morfológicos evaluados en relación con el comportamiento agronómico. Cuando la diversidad genética entre especies y dentro de especies es fácilmente observable, los descriptores morfológicos suministran información que puede evitar duplicaciones del mismo material y minimizar la sobreestimación de la diversidad existente (Becerra y Paredes, 2000). Actualmente, la (UPOV, 2010) reporta una serie de descriptores para papaya, los cuales pueden ser analizados con el uso de herramientas multivariadas, como el análisis de componentes principales y de conglomerados para conocer la variabilidad genética a través de la caracterización morfológica de *Carica papaya* L. y permitir hacer uso de este recurso en la selección de genotipos élites y a su vez ser incluidos en programas de mejoramiento genético.

II. 2. HIPÓTESIS

La caracterización fenotípica de flor y fruto basada en descriptores de papaya reportados por UPOV y el análisis multivariado permitirán la clasificación y selección de aquellos individuos que presenten las características deseadas para su mejoramiento genético en la morfología de flor y fruto dentro de las poblaciones F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 en *Carica papaya* L.

II.3. OBJETIVOS

II.3.1. Objetivo general

Caracterizar morfológicamente el tipo sexual de flor y la morfología del fruto del material parental y su progenie F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L., con el fin de seleccionar el o los genotipos que posean el carácter de interés útil en el programa de mejoramiento genético de papaya en el CICY.

II.3.2. Objetivos específicos

Caracterizar morfológicamente el tipo sexual de flor y la morfología del fruto del material vegetal denominado parental receptor Criolla Línea 7 y el parental donador de polen Maradol 22, así como la progenie F1 y F2 obtenida a través de la cruce intraespecífica L7xM22 al momento que la planta se encuentre en etapa de completo desarrollo.

Evaluar y analizar los datos agromorfológicos mediante estadísticos univariados y multivariados como base para la clasificación y selección fenotípica de aquellos individuos que reúnan las características deseadas tanto de sexo de la planta como color de pulpa, y tamaño del fruto de papaya.

II.4. MATERIAL Y MÉTODOS

II.4.1 Condiciones experimentales

El cultivo de parentales y progenie F1 y F2 (L7xM22) se desarrolló en un área del vivero del Centro de investigación Científica de Yucatán A. C.; protegido con una barrera perimetral formada con malla antiáfidos de tres metros de altura aproximadamente.

II.4.2 Obtención de material vegetal

Las plantas F1 y F2 evaluadas corresponden a la cruce intraespecífica Línea criolla 7 por Maradol (L7x M22). El parental L7 proviene de colectas realizadas en Cancún, Quintana Roo (ver Figura 2.1a), el parental M22 proviene de una plantación comercial (*Carica papaya* L. var. (Maradol). Ambos materiales forman parte de la colección de materiales de papaya perteneciente al grupo de trabajo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

En la Figura 2.1 se indican diversas líneas criollas originadas a partir de un fruto (colectado en Cancún, Quintana Roo). Fueron 11 líneas (L) en total, donde 6 fueron hermafroditas (L1, L4, L5, L7, L9 y L11), 3 fueron masculinas (L2, L3 y L10) y solamente 2 fueron femeninas (L6 y L8). Las plantas hermafroditas fueron utilizadas como receptor de polen.

El material var. Maradol que sirvió como donador de polen, se tomó de una colección establecida en el invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán (Figura 2.2).

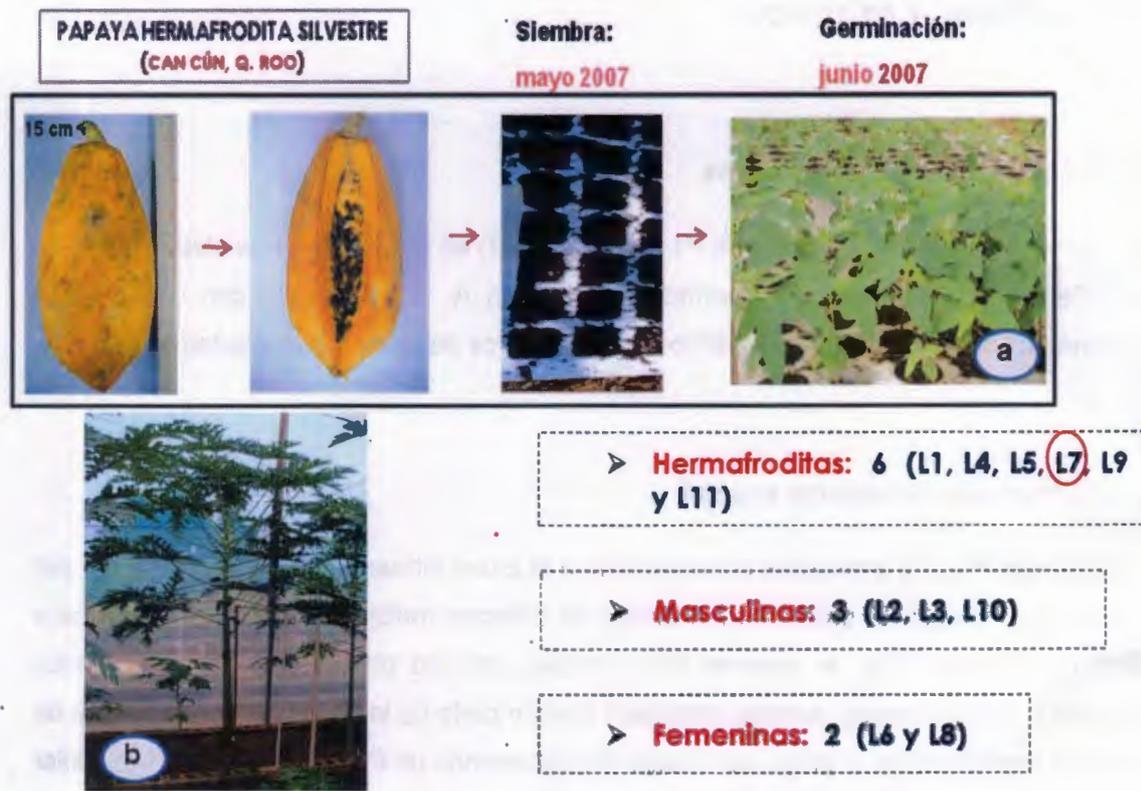


Figura 2.1. a) Esquema de la obtención de material vegetal criollo útil para la cruce intraespecífica y generar variabilidad genética de *Carica papaya* L. b) Planta madre de Criolla Línea 7 generada a partir del fruto colectado en Cancún, Quintana Roo (Ing. F. Contreras).



Figura 2.2. Colección de plantas de papaya 'Maradol' establecida en condiciones de invernadero como fuente de producción de polen.

II.4.3 Variables evaluadas

La caracterización morfológica del fruto se realizó con 14 descriptores reportados por la UPOV, 2010. Esta se efectuó en 28 plantas adultas hermafroditas de la población F1 provenientes de la cruce intraespecífica Línea criolla 7 (L7) X Maradol (M22), y 26 plantas adultas la población F2 provenientes individuos F1 (H70B, H77B y H90B) autopolinizados. Cabe mencionar que inicialmente la evaluación estaba programada para 165 plantas F2, sin embargo debido a la presencia de una enfermedad viral el 85% de la población a evaluar fue descartada. Los descriptores o variables cuantitativas del fruto evaluadas fueron las siguientes:

- ❖ Peso de fruto (PF)
- ❖ Longitud de fruto (LF)
- ❖ Diámetro de fruto (DF)
- ❖ Grosor de pulpa (GP)
- ❖ Determinación del color (*L, a, b, h* y *C*)
- ❖ Contenido de carotenoides (Licopeno y beta caroteno en pulpa (Li-P, β C-P))
- ❖ Color Visual
- ❖ Sólidos solubles totales ($^{\circ}$ BRIX)
- ❖ pH
- ❖ Acidez

II.4.3.1 Determinación de PF, LF, DF y GP

Al momento de la cosecha se obtuvo el PF, LF y DF, con apoyo de una balanza granataria y un vernier graduado en cm. El GP se obtuvo en el momento de madurez de consumo mediante una regla graduada en centímetro considerando el espesor total del mesocarpio.

II.4.3.2 Determinación de color (colorimetría)

El análisis de color se realizó sobre la cáscara y pulpa con un colorímetro realizando 3 disparos apoyando el visor. La cromaticidad fue registrada y basada en las coordenadas de color (*L, a, b, h* y *C*) de la Comisión Internacional de L'Eclairage (Weatherall y Lee, 1991). *L* representa la claridad relativa de los colores en una escala de 0 a 100, mientras que la escala de *a* y *b* se extiende -100 a 100, donde *a* es negativo para el verde y positivo para el rojo y *b* es negativo para el azul y positivo para el amarillo. El valor de Hue (*h*) o

ángulo de tono o matiz fue calculado como $(\text{arc tg de } b/a)$ en grados y la cromaticidad (**C**), el cual representa la saturación del color o intensidad fue calculado mediante la expresión $(a^2 + b^2)^{1/2}$

Los parámetros bioquímicos tales como carotenoides, sólidos solubles °Brix, pH y acidez fueron evaluados de la siguiente manera:

II.4.3.3 Extracción y obtención del contenido de carotenoides

Se realizó según lo descrito por (Nagata y Yamashita, 1992). La cuantificación de los carotenoides totales se determinó mediante la lectura de un espectrofotómetro, del cual se registraron lecturas a $\lambda = 453 \text{ nm}$, 505 nm , 645 nm y 663 nm . Los extractos se obtuvieron mediante la maceración con el politrón tanto de pulpa como de cáscara del fruto, con la solución compuesta de acetona y hexano (4:6). La identificación de los carotenoides se basó en la aplicación de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Licopenos (mg/100ml)} = -0.0458 A(663) + 0.204 A(645) + 0.372A(505) - 0.0806 A(453)$$

$$\beta\text{-carotenos (mg/100ml)} = 0.216 A(663) - 1.22 A(645) - 0.304A(505) + 0.452 A(453)$$

donde: A453, A505, A645, A663: representan los valores de absorbancia y su respectiva longitud de onda.

II.4.3.4 Sólidos solubles (°Brix)

Se determinó en muestras preparadas con 10 g de pulpa macerada en 40 ml de agua destilada mediante un refractómetro digital ATAGO (GARDCO, Florida) bajo condiciones de 20 °C.

II.4.3.5 pH

Se licuaron 10 g de pulpa y 50 ml de agua destilada; la mezcla se filtró, posteriormente se midió el pH con un potenciómetro (OAKTON, Singapur) a una temperatura de 20 °C.

II.4.3.6 Acidez titulable

Después de determinar el pH la solución fue titulada con NaOH al 0.1 N a un pH de 8.1 mediante un sistema automatizado con el Metrohm TITRINO SM 702 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) según el método de (A. O. A. C., 1990).

El porcentaje de acidez se calculó así: $[(V*N*Pe)/vM]*100=\%$ ácido cítrico

Donde:

V: volumen en ml de NaOH consumido, vM: volumen de la muestra

N: Normalidad del NaOH

Pe: 0.64 g meq⁻¹ (factor de unidad de masa del NaOH), el cual se divide entre 100 por que se requiere un dato en por ciento (0.064).

Para los descriptores cuantitativos del fruto se utilizaron los frutos de las plantas F1 y F2 que fueron previamente embolsados para asegurar el éxito de autopolinización manual evitando la contaminación con polen de otra planta.

II.4.4 Análisis estadísticos

El análisis de datos fue mediante estadística descriptiva de la población evaluada, a través del procedimiento UNIVARIATE del paquete estadístico SAS 9.0 (Statistical Analysis System). Además, los datos también se sometieron al análisis multivariado de conglomerado para construir el dendograma correspondiente. El análisis de ordenación de componentes principales se utilizó para identificar los caracteres que contribuyen en mayor medida para diferenciar a los individuos evaluados con NTSYS.

II.5. RESULTADOS

La población F1 obtenida de la cruce intraespecífica Criolla Línea 7 (L7) x Maradol 22 (M22) y la F2 proveniente de autopolinizaciones de los genotipos H90B, H77B y H70B desarrollaron solamente plantas femeninas y hermafroditas. Para la F1 los valores fueron 28 hermafroditas y 14 femeninas; lo que representa un 67% de hermafroditismo y un 33% de feminismo en la población F1. Dentro de la progenie F2 los porcentajes tuvieron ligeras variaciones, excepto en la progenie F2 proveniente de H70B, sin embargo se mantuvo muy próximo a la proporción de 2:1 esperada. Del genotipo H90B desarrollaron 52 hermafroditas y 29 femeninas; lo que representa un 64.2% de hermafroditismo y un 35.8% de feminismo en la población F2. El genotipo H77B presentó 53 hermafroditas y 21 femeninas; lo que representa un 71.6% de hermafroditismo y un 28.4% de feminismo en la población F2. El genotipo H70B mostró la presencia de 28 hermafroditas y 14 femeninas; lo que representa un 67% de hermafroditismo y un 33% de feminismo en la población F2. (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Comparación del número de individuos segregantes según el carácter de sexo en la población F1 y F2 generada a partir de la cruce interespecífica de *Carica papaya* L. Criolla Línea 7 x Maradol 22.

Carácter	Cruza	Progenie "F1"		Autopolinización	Progenie "F2"	
		Hermafrodita/femenina			Hermafrodita/femenina	
Sexo	L7XM22	28	14	H90B	52	29
%		66.6	33.3		64.2	35.8
				H77B	53	21
%					71.6	28.4
				H70B	28	14
%					66.6	33.3

De la población F1 (L7xM22) solamente las plantas hermafroditas fueron consideradas y analizadas en el proceso de selección convencional.

Para ello se realizó un análisis multivariado al conjunto de 13 variables asociadas a la morfología del fruto en 28 genotipos F1 de papaya (L7xM22) y 26 genotipos F2

provenientes de autopolinizaciones de H90B, H77B y H70B, para determinar cuáles de ellas aportan la mayor variabilidad en dicha población F1 y F2.

II.5.1 Análisis de componentes principales

Los componentes principales que describen la mayor variación de los datos, así como también la proporción absoluta y acumulada se muestran en el Cuadro 2.3. Los caracteres significativos y que forman parte de los tres componentes principales describen el 66.38% de la variación total que existe en los 28 genotipos F1 y el 71.06% de la variación total que existe en los 26 genotipos F2 de *Carica papaya* L. provenientes de L7xM22.

Dentro de la progenie F1 el componente principal 1 (CP1) explica 39.35% de la variabilidad total y la variable con mayor correlación positiva fue: componente de color *a* (*a*-P; 0.8017), mientras que las variables con correlación negativa son: componente de color *L* (*L*-P; -0.6583), componente de color *b* (*b*-P; -0.7602), componente de color *h* (*h*-P; -0.9212) y componente de color *C* (*C*-P; -0.7238). Es decir, correlaciones con un mayor valor positivo representan genotipos con frutos que poseen pulpa naranja rojiza. Y a su vez, correlaciones con valores negativos representan genotipos con el color de pulpa amarilla. En la progenie F2 el componente principal 1 (CP1) explica 32.16% de la variabilidad total; y las cuatro variable que mayor correlación positiva presentaron fueron componente de color *h* (*h*-P; 0.9381), componente de color *b* (*b*-P; 0.9245), componente de color *L* (*L*-P; 0.7797) y componente de color *C* (*C*-P; 0.7381). Los componentes de color son los que aportan la mayor variabilidad en ambas poblaciones F1 y F2.

La coloración tanto de la cáscara como la pulpa del fruto de papaya es un aspecto que establece su aceptación en el mercado, el cual está determinado por la variedad y las condiciones climáticas en que se desarrolle la planta, para su evaluación se requiere obtener los valores de los componentes de color *L*, *a*, *b*, *h* y *C* de la escala colorimétrica, los cuales son los que están aportando la mayor variabilidad en este estudio.

Así, los datos de la progenie F1 obtenidos para los componentes de color *L*, *a*, *b*, *h* y *C* en los genotipos con pulpa naranja rojizo fueron 54.68, 28.09, 44.09, 67.16 y 47.91, respectivamente, mientras que para los genotipos con pulpa amarilla corresponde a 57.10,

15.66, 49.62, 72.21 y 52.20, respectivamente. En tanto, los valores para los componentes de color *L*, *a*, *b*, *h* y *C* en la progenie F2 fueron de 54.28, 28.42, 39.74, 54.78 y 48.49, respectivamente, mientras que valores de 62.52, 18.05, 52.69, 68.98 y 53.84, respectivamente, correspondieron a los genotipos con color de pulpa amarilla.

Para la progenie F1 en el componente principal 2 (CP2) se explica el 17.52% de variación y las variables que la describen son peso de fruto (PF; -0.6125), longitud de fruto (LF; -0.8018) y diámetro de fruto (DF; -0.6966). En la progenie F2 el componente principal 2 (CP2) explica el 19.84% de la varianza y se describe con las variables de diámetro de fruto (DF; 0.8241), longitud de fruto (LF; -0.7320) y β -Carotenos (β -C; 0.6739). Estos caracteres se correlacionan con la variación en la dimensión o tamaño del fruto presentes en F1 y F2, además, la variación de la presencia de β -carotenos del fruto presente también en la progenie F2.

Los datos dentro de la progenie F1 para PF grande fue de 858.7-2230 g, para genotipos de fruto medianos fue de 542.4-691.4 g y para genotipos con frutos pequeños fue de 449.2-469.5 g. A su vez los datos de LF grande fue 19.6-27 cm, para genotipos de fruto medianos fue de 16.7-18.3 cm y para genotipos con frutos pequeños fue de 15.3-16.2 cm, correspondiendo un DF grande de 10.8-13 cm, en genotipos de fruto medianos fue de 8.7-9.4 cm y para genotipos con frutos pequeños fue de 8.0-8.67 cm. Los datos de DF y LF dentro de la progenie F2 fueron de 12.5 cm y 14.2 cm, respectivamente para genotipos de poco diámetro con frutos cortos, valores 12.6 cm y 23.1 cm, respectivamente para genotipos de diámetro intermedio y frutos más largos, y valores de 13.6 cm y 22.0 cm, respectivamente para frutos de mayor diámetro y frutos largos. Además, para la población F2 la presencia de β -carotenos varió de 13.37 mg.g⁻¹ peso fresco para los genotipos de mayor concentración respecto a 5.9 mg.g⁻¹ peso fresco presente en los genotipos de menor concentración de este carotenoide en la pulpa del fruto.

En la progenie F1 el componente principal 3 (CP3), únicamente con la variable sólidos solubles totales (SST; -0.7832) explica el 9.50 % de la variabilidad total. Esta variable presentó un valor de correlación negativo; es decir, la dispersión de los genotipos se da a partir de aquellos con mayor dulzura hacia los menos dulces conforme el valor de correlación tiende a ser positivo. Mientras que este componente (CP3) en la progenie F2

Cuadro 2.2. Proporción de la varianza total, vectores y valores propios de los primeros tres componentes principales analizados en 28 genotipos F1 y 26 genotipos F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L.

Carácter	Componentes principales					
	CP1		CP2		CP3	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2
PF	0.4603	0.0109	<u>-0.6125</u>	0.2652	0.2935	<u>0.7868</u>
LF	0.3890	0.1834	<u>-0.8018</u>	<u>-0.7320</u>	-0.1860	0.2791
DF	0.4029	-0.0113	<u>-0.6966</u>	<u>0.8241</u>	-0.3663	-0.1101
pH	-0.6887	-0.0102	-0.0028	0.2515	0.0631	0.4433
AT	0.2247	-0.2619	0.4514	0.1940	0.0519	-0.2678
SST	0.4284	-0.0272	-0.0972	-0.1796	<u>-0.7832</u>	<u>-0.7071</u>
Li	0.5633	-0.3603	-0.4930	0.2254	0.2940	0.0875
β -C	-0.4345	-0.0119	0.1204	<u>0.6739</u>	-0.5172	-0.2482
L-P	<u>-0.6583</u>	<u>0.7797</u>	-0.4485	0.4728	0.3977	-0.0328
a-P	<u>0.8017</u>	-0.6303	0.0338	0.4746	0.0942	0.2336
b-P	<u>-0.7602</u>	<u>0.9245</u>	-0.4158	0.2335	-0.0424	-0.1284
h-P	<u>-0.9212</u>	<u>0.9381</u>	-0.1740	-0.2245	-0.0896	-0.1801
C-P	<u>0.8901</u>	<u>0.7381</u>	0.0529	0.4591	0.0430	-0.2482
Valor propio	4.90	4.18	2.63	2.75	1.43	2.04
Varianza explicada (%)	39.35	32.16	17.52	19.84	9.50	19.06
Varianza acumulada (%)	39.35	32.16	56.88	52.00	66.38	71.06

PF = peso de fruto (kg), LF = longitud de fruto (cm), DF = diámetro de fruto (cm), pH = potencial hidrogeno, AT = acidez titulable (% ácido cítrico), SST = Sólidos solubles totales (°Brix), CPU= color de pulpa visual, Li = licopenos (mg.g⁻¹ peso fresco), β -C: beta-carotenos = (mg mg.g⁻¹ peso fresco). Escala para componentes de color de pulpa: L: 0 a 100 (oscuro a luminoso), a: -100 a +100 (de verde a rojo), b: -100 a +100 (de azul a amarillo), h: 0 a 90 (de rojo a amarillo), C: intensidad de color (de menos a más amarillo).

explica el 19.06% de la variabilidad total con las variables peso de fruto (0.7868) y sólidos solubles totales (SST; -0.7071). La variación en los sólidos solubles totales que imprimen dulzura a los frutos aporta gran parte de la variabilidad en ambas poblaciones F1 y F2. Los valores medios indican que los frutos de la progenie F1 poseen un valor de SST de 11.8 °Brix, aunado a una baja acidez 0.05 y un pH de 5.1. Asimismo, estos valores se mantuvieron constantes dentro de la progenie F2 donde SST de 11.84 °Brix, una baja acidez de 0.052 y un pH de 5.1.

La dispersión de los 28 genotipos F1 y 26 genotipos F2 de *Carica papaya* L. provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 basada en los componentes principales 1 y 2 se muestra en el diagrama bidimensional de la Figura 2. El diagrama de dispersión sirve para ubicar las distancias entre los puntos en términos de similitud, o bien, para buscar conjuntos de individuos similares, con la garantía de que la pérdida de información es mínima y que se ha recogido las fuentes de variabilidad más importantes en el conjunto de datos (Villardón, 2009). En él se consideró solo el 56.87% de variabilidad total para progenie F1 y 52% de variabilidad total para progenie F2. Se indicó la agrupación de estos genotipos en cuatro grupos bien definidos.

Dentro la progenie F1 el grupo 1 se caracterizó por integrar genotipos de *Carica papaya* L. que desarrollaron frutos con color de pulpa naranja-rojizo, mientras que el grupo 2 integró genotipos que desarrollaron frutos con color de pulpa amarilla, ambos grupos, con valores de peso, longitud y diámetro del fruto que los clasifica como ejemplares que poseen frutos de dimensiones pequeñas. El grupo 3 se integró por genotipos de *Carica papaya* L. con color de pulpa amarilla y el grupo 4 por genotipos con presencia de pulpa naranja rojiza, ambos grupos clasificaron genotipos con frutos grandes.

Dentro la progenie F2 el grupo 1 se caracterizó por integrar genotipos de *Carica papaya* L. que desarrollaron frutos con color de pulpa amarilla con diámetro de fruto pequeño, mientras que el grupo 2 integró genotipos que desarrollaron frutos con color de pulpa naranja-rojizo, con valores de diámetro y longitud de fruto que los clasifica como ejemplares que poseen frutos largos y con mayor diámetro. El grupo 3 se integró por genotipos de *Carica papaya* L. con color de pulpa naranja-rojizo con un diámetro y longitud de fruto que los clasifica como ejemplares que poseen frutos de tamaño pequeños y el grupo 4 se formó

por genotipos con presencia de pulpa naranja rojiza pero con diámetro y longitud de fruto que los clasificó como ejemplares que poseen frutos largos y angostos.

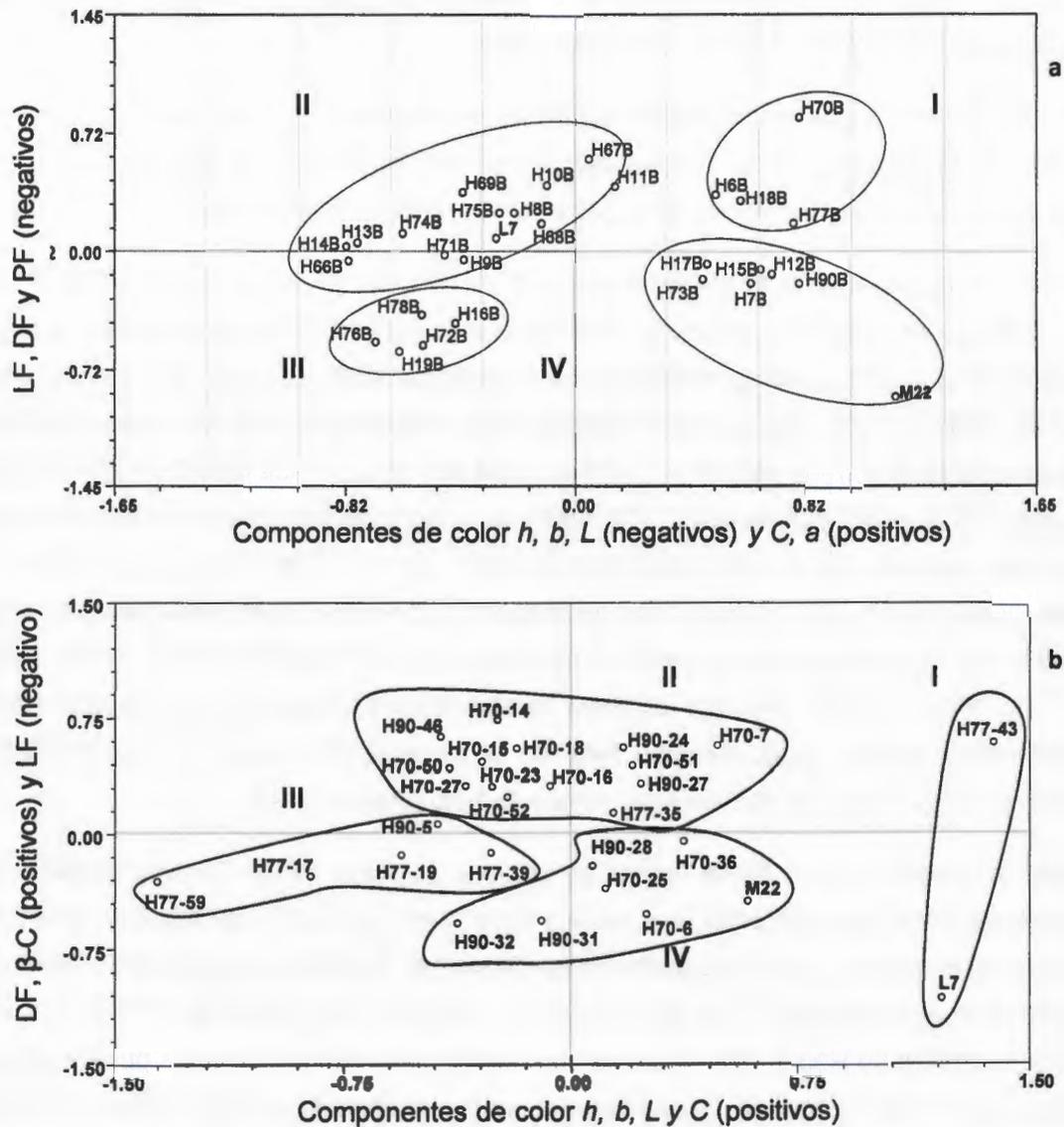


Figura 2.3. Diagrama de dispersión tipo Biplot de progenie F1 (a) y F2 (b) proveniente de la cruda intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L. basado en los componentes principales 1 y 2.

II.5.2 Análisis y formación de conglomerados

En la Figura 2.4 se muestra el dendrograma de la forma de conglomeración de 28 genotipos F1 y 26 genotipos F2 de *Carica papaya* L. provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22, definida mediante la distancia Euclideana al cuadrado para determinar los diferentes grupos con características morfométricas similares.

Se definieron seis grupos principales dentro de la progenie F1 y cinco grupos principales dentro de la progenie F2. En general, la agrupación coincidió con los grupos proyectados por los componentes principales 1 y 2 del diagrama bidimensional (Figura 2. 4).

Dentro de la progenie F1 en el primer grupo se ubicaron los genotipos H19B, H72B, H76B y H78B caracterizado por presentar un color de pulpa amarillo y frutos grandes, mientras que en el segundo grupo se integraron a los genotipos H9B, H11B, H13B, H14B, H66B, H71B, H74B y H75B, este grupo se caracterizó por desarrollar frutos con pulpa amarilla y el tamaño del fruto más pequeño. El tercer grupo se formó con los genotipos H8B, H10B, H16B, H68B, H69B y el parental L7 también se caracterizó por presentar color de pulpa amarilla pero con un tamaño intermedio de fruto. En el cuarto grupo se reunieron los genotipos H12B, H18B, H70B, H77B y H90B quienes presentaron color de la pulpa naranja-rojizo con frutos pequeños. El quinto grupo constó de seis genotipos (H6B, H7B, H15B, H17B, H67B y H73B) con color de pulpa naranja-rojizo y el tamaño del fruto intermedio. Finalmente el sexto grupo formado solo con el parental M22, cuyo color de pulpa fue naranja-rojizo, mostro el tamaño más grande de fruto (Figura 2. 4a).

Para la progenie F2 el primer grupo se ubicó el genotipo H70B-43 caracterizado por presentar color de pulpa amarilla y fruto grande, mientras que en el segundo grupo se incluyó al parental L7, este se caracterizó por desarrollar frutos con pulpa amarilla pero con tamaño de fruto pequeño. En el tercer grupo se integraron los genotipos H77-17, H77-19, H77-39, H77-59 y H90-5, este grupo se caracterizó por presentar color de pulpa naranja-rojiza, con frutos pequeños. El cuarto grupo se formó con los genotipos H70-7, H70-27, H70-23, H70-16, H70-14, H70-52, H70-51, H70-18, H70-50, H70-15, H70-46, H70-7, H70-7, H70-7, H70-7, H77-35, H90-27 y H90-24 quienes presentaron de pulpa naranja-rojiza con frutos de tamaño intermedio. Y el quinto grupo constó de los genotipos H70-6, H70-25, H70-36, H90-28, H90-28, H90-31 y H90-32 y el parental M22, estos presentaron pulpa naranja-rojiza y frutos grandes (Figura 2.4b).

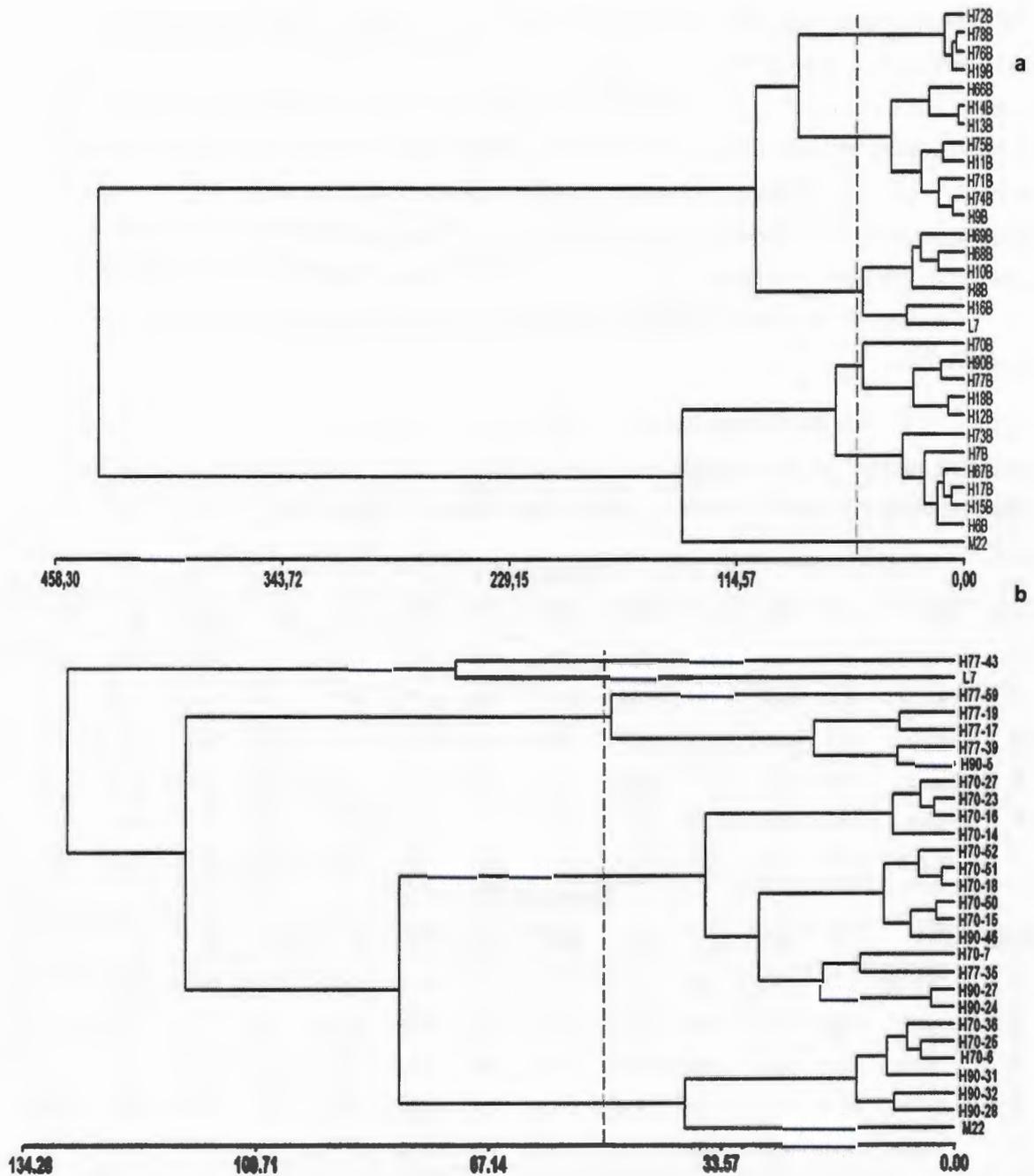


Figura 2.4. Dendrograma de conglomerados basado en distancias euclídeas al cuadrado obtenido con el método Ward's para caracteres evaluados en el fruto de 28 y 26 genotipos F2 proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L.

Después de haber obtenido los grupos se realizó un concentrado de las medias de los caracteres evaluados mediante el análisis de conglomerados los datos se aprecian en el Cuadro 2.3. Al igual que el análisis de componentes principales, el análisis de conglomerados separó inicialmente a aquellos genotipos con pulpa color naranja rojizo de aquellos que presentaron pulpa color amarilla, sin embargo, también se dio un agrupamiento de genotipos según el tamaño de los frutos, determinando frutos grandes, medianos y pequeños tanto para pulpa color naranja rojizo y amarilla dentro de la progenie F1. Y únicamente dentro de aquellos genotipos con pulpa de color naranja-rojizo en la progenie F2.

Cuadro 2.3. Valores medios de caracteres evaluados en el fruto por grupo formado mediante el análisis de agrupamiento en población F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica de *Carica papaya* L. entre Criolla Línea 7 x Maradol 22.

Progenie F1													
Grupo	PF	LF	DF	LI	β-C	SST	AT	PH	L	a	b	h	C
1	858.73	19.6	10.8	0.08	5.06	12.29	0.03	5.28	62.27	14.81	56.64	75.38	58.55
2	487.26	15.8	8.23	0.15	4.14	8.08	0.03	5.33	60.27	14.56	49.42	73.45	51.58
3	520.3	17.4	8.47	0.05	4.25	13.59	0.04	5.21	53.66	14.70	50.07	73.61	52.20
4	622.3	17.4	9.09	1.08	3.06	13.79	0.06	5.12	51.12	22.34	41.44	61.46	47.19
5	706.6	18.5	9.89	0.97	2.58	12.79	0.04	5.12	52.41	18.23	40.14	65.41	44.13
6	2230.0	27.0	13.3	3.75	0.35	11.00	0.02	5.00	54.48	23.45	42.15	60.91	48.23

Progenie F2													
Grupo	PF	LF	DF	LI	β-C	SST	AT	PH	L	a	b	h	C
1	1427.6	23.5	12.3	0.30	13.37	12.00	0.05	5.07	68.72	21.20	52.52	63.70	52.77
2	400.0	16.0	7.5	0.02	2.43	13.0	0.03	4.90	56.32	14.91	52.85	74.25	54.91
3	870.8	14.2	12.5	9.99	6.39	11.9	0.07	5.14	50.3	28.71	34.8	51.6	43.96
4	1480.5	22.4	12.6	9.71	6.28	11.4	0.05	5.25	55.5	29.14	42.35	55.51	51.40
5	1536.4	23.0	13.6	8.61	4.9	10.9	0.04	5.21	56.5	27.53	42.11	57.22	50.00

PF = peso de fruto (g), LF = longitud de fruto (cm), DF = diámetro de fruto (cm), SST = Sólidos solubles totales (° Brix), AT = acidez titulable (% ácido cítrico) pH = potencial hidrogeno, LI = licopenos (mg.g⁻¹ peso fresco), β-C: beta-caroteno = (mg mg.g⁻¹ peso fresco). Escala para componentes de color de pulpa: L: 0 a 100 (oscuro a luminoso), a: -100 a +100 (de verde a rojo), b: -100 a +100 (de azul a amarillo), h: 0 a 90 (de rojo a amarillo), C: intensidad de color (de menos a más amarillo).

II.6. DISCUSION

La tendencia del número de plantas hermafroditas presentes en una población de papaya es atribuida al origen parental de la semilla, es decir, se ve favorecida cuando proviene de un fruto autofecundado o de ambos parentales hermafroditas como lo indicaron (Esquivel *et al.*, 2008b) y se confirmó en esta investigación. Estos resultados concuerdan de manera proporcional con lo reportado por (Esquivel *et al.*, 2008a) para los cultivares HGxMR (65.5 y 34.5%, hermafroditas y femeninas, respectivamente), HGxMA (57.8 y 42.2%, hermafroditas y femeninas, respectivamente) y Maradol Roja (68.9 y 31.1%, hermafroditas y femeninas, respectivamente).

Por otra parte, uno de los objetivos del mejoramiento genético de *Carica papaya* L. es incrementar la calidad de fruto incluyendo; sabor, color y forma del fruto. Al respecto, (Picha, 2006) menciona que el color, la textura, el tamaño y el sabor siguen siendo características predominantes en la mejora de calidad del fruto pero pueden variar en función del destino del mercado siendo necesario contar con materiales de papaya con amplia variabilidad respecto a estos caracteres. Los resultados de esta investigación arrojaron que la mayor variabilidad dentro de la progenie F1 y F2 se reflejó en los componentes de color *L*, *a*, *b*, *h*, y *C*, clasificando a los genotipos de cada población de acuerdo al color de pulpa naranja-rojizo y al color de pulpa amarilla. Cuyos valores fueron de 54.68, 28.09, 44.09, 67.16 y 47.91, respectivamente para pulpa naranja-rojizo, y 57.10, 15.66, 49.62, 72.21 y 52.20, respectivamente para pulpa amarilla en progenie F1. En la progenie F2 fueron de 54.28, 28.42, 39.74, 54.78 y 48.49, respectivamente para pulpa naranja-rojiza, y de 62.52, 18.05, 52.69, 68.98 y 53.84, respectivamente para pulpa amarilla.

Al respecto, (Sañudo *et al.*, 2008) al evaluar las coordenadas *L*, *h* y *C* en papaya Maradol roja obtuvieron valores de 55.3, 67 y 47, respectivamente, datos que concuerdan con los obtenidos en esta investigación para los genotipos F1 con pulpa naranja rojiza, y se aproximan a los obtenidos en la progenie F2. A su vez, (Santamaría *et al.*, 2009) reportaron para Maradol valores similares a los del presente estudio, siendo 51, 23, 36 y 60 para *L*, *a*, *b* y *h*, respectivamente.

Dentro de la progenie F1 según la clasificación por el color de pulpa la proporción esperada fue aproximada a 1:1, es decir, el 53.6% de la progenie F1 tuvo pulpa amarilla y el 46.4% presentó pulpa naranja-rojizo, mientras que en la progenie F2 esta proporción fue próxima al 100% respecto al color de pulpa naranja-rojizo ya que esta progenie es proveniente de genotipos F1 con ese carácter, el cual se mantuvo y se mantendrá como homocigoto recesivo en las siguientes generaciones filiales por autofecundación.

La heredabilidad de PF, LF y DF en esta investigación muestran una dominancia del parental L7 dentro de la progenie F1. Sin embargo valores obtenidos para estos caracteres dentro de la progenie F2 indican que se favoreció la segregación del parental M22.

La variabilidad que se muestra para PF, LF y DF, es evidente para progenie F1 en PF con valores de 858.7-2230 g (fruto grande), de 542.4-691.4 g (fruto mediano) de 449.2-469.5 g (fruto pequeño), a su vez los datos de LF fue de 19.6-27 cm (fruto grande), de 16.7-18.3 cm (fruto mediano) y de 15.3-16.2 cm (fruto pequeño), y un DF de 10.8-13 cm, 8.7-9.4 cm y 8.0-8.67 cm, respectivamente. En la progenie F2 esta variabilidad se reflejó en el orden de los caracteres DF, LF y PF con valores de 12.5 y 14.2 cm, respectivamente para genotipos de poco diámetro con frutos cortos y PF de 870.8 g, valores de 12.6 cm y 23.1 cm, respectivamente para genotipos de diámetro intermedio y frutos más largos con PF de 1536.4 g, y valores de 13.6 cm y 22.0 cm, respectivamente para frutos de mayor diámetro y frutos largos con PF de 1480.5 g.

Lo anterior indica que dentro de ambas poblaciones el tamaño del fruto varió de grande, mediano y pequeño, característica que favorece la identificación y selección de genotipos que reúnan los caracteres deseables por el fitomejorador. Actualmente, existe la inquietud de obtener materiales de *Carica papaya* L. de tamaño pequeño, tanto en progenie F1 y F2 se cuenta con genotipos con parámetros morfológicos del fruto que infieren dimensiones del fruto de talla pequeña, particularidad que puede ser aprovechada para generar cultivares destinados al mercado de exportación, ya que los frutos grandes (>1000 g) no son apropiados para el comercio exterior como lo señala (Alonso *et al.*, 2008). Al respecto, (De Morais *et al.*, 2007) reportan que los frutos de papaya tipo 'SOLO' con peso medio de 460 a 690 g son altamente preferidos para la exportación, debido a su facilidad de manipulación, empaquetado y transporte. Por su parte, (Ferraguetti, 2003) reporta que el mercado latinoamericano prefiere frutos más grandes por lo que se sugiere prestar

atención a aquellos materiales dentro de la progenie F1 y F2 que puedan ser útiles para mantener dicho carácter en *Carica papaya* L. proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22. De igual manera (Picha, 2006) menciona que la selección de los genotipos puede variar en función del destino del mercado, siendo necesario contar con materiales de papaya con amplia variabilidad en los caracteres de interés.

Los datos obtenidos para el aspecto físico-químico de la pulpa dentro de los genotipos F1 y F2 fueron similares con valores SST de 11.8°Brix, acidez 0.05 y un pH de 5.1. Estos valores los hacen genotipos con frutos de delicado sabor al paladar. Es importante recalcar que con una acidez baja y SST altos se acentúa el sabor del fruto de papaya. Trabajos de caracterización química del fruto de papaya Maradol realizados por (Belandria *et al.*, 2010) generaron datos de acidez entre 0.04 a 0.76%. Mientras que (Fonseca *et al.*, (2003) reportaron valores de 0.15% para el cultivar Sunrise 'SOLO' y de 0.12% para Golden, a su vez (Alonso *et al.*, 2008) obtuvieron valores de acidez entre 0.12, 0.13 y 0.04% en cultivar Golden, BH-65 y Baixinho, respectivamente. El valor de pH es similar a los reportados por (Sañudo *et al.*, 2008) en papaya Maradol (5.35-5.50) y (Belandria *et al.*, 2010) (4.65-5.84) en el mismo cultivar. El grado de dulzura de los frutos de la progenie F1 y F2 se representa con un valor medio de 11.8 °Brix, dato que coincide con lo reportado por (Sañudo *et al.*, 2008) quienes obtuvieron valores entre 10.5-12.5 °Brix en frutos de papaya Maradol. Dentro de la población F1 y F2 hay individuos que poseen frutos con menor y mayor valores de SST, lo que concuerda con lo que reportan (Materano *et al.*, 2004) quienes obtuvieron valores de 13.5-15.9 °Brix en frutos de papaya. Por el contrario, (Acosta *et al.*, 2001) encontraron un valor de 9.1 en papaya Maradol.

II.7. CONCLUSIONES

La identificación del sexo morfológicamente en las plantas de *Carica papaya* L. provenientes de la cruce L7xM22 resultó con una proporción aproximada de 2:1, es decir, se obtuvo entre el 67 y 72% de plantas hermafroditas y entre el 28.4 y 35.8% de plantas femeninas en progenie F1 y progenie F2; respectivamente; lo cual corresponde a la segregación del carácter del sexo cuando la polinización artificial es entre dos individuos hermafroditas o autopolinizados como fue el caso de los parentales L7 y M22 y los genotipos H90B, H77B y H70B.

La progenie F1 presentan una morfología de fruto intermedia entre sus progenitores, pero la distribución de los datos evidencia un efecto de herencia dominante provenientes de la madre (L7), y provenientes del parental M22 dentro de la progenie F2, condición que confiere variabilidad dentro de cada población para identificar individuos con características deseables y útiles para programas de mejoramiento genético de *Carica papaya* L. en futuras generaciones.

La variabilidad presente en los caracteres morfológicos del fruto de la progenie F1 y F2 tales como los componentes de color (*L, a, b, h* y *C*), y dimensiones del fruto de PF, LF y DF, fueron útiles para identificar y agrupar aquellos individuos según el color de pulpa y el tamaño del fruto dentro de la progenie F1 y F2. De tal manera, que dentro de la población F1 se puede hacer la selección de individuos que presente frutos grandes, medianos o pequeños con color de pulpa naranja rojizo y amarilla. Mientras que la selección dentro de la progenie F2 se limita hacia frutos de diferentes tamaños con color de pulpa naranja rojizo.

La variabilidad de los componentes de color (*L, a, b, h* y *C*) sirvió para identificar y agrupar aquellos individuos que tuvieran coloración de pulpa naranja rojizo y pulpa amarilla, pero no para sus variantes.

Los genotipos F1 H90B, H77B, y H70B, y los genotipos F2 H90-32, H70-18, H70-25 y H70-50 reúnen las características morfológicas del fruto de interés y útiles en el programa de mejoramiento genético de papaya para mejorar el tamaño y color del fruto ya que sus frutos son de pulpa color naranja rojizo y presentan dimensiones de PF, DF, LF y SST aceptables.

II. 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. O. A. C., (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Agricultural Chemistry. Washington D.C. USA. 500 p.
- Acosta, M., D. Nieto, J. L. Álvarez y F. Delgadillo (2001). Calidad y tolerancia en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) a la inoculación de hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., en poscosecha. Revista Chapingo Serie Horticultura, 7, 119-130.
- Alonso, M., Y. Tornet, M. Aranguren, R. Ramos, K. Rodríguez y M. C. Pastor (2008). Caracterización de los frutos de cuatro cultivares de papaya del grupo SOLO, introducidos en Cuba. Agronomía Costarricense, 32, 169-175.
- Becerra, V., y M. Paredes (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica (Santiago), 60(3), 270-281.
- Belandria, D., V. Velandria y C. Navarro (2010). Caracterización física, química y organoléptica de los frutos de lechosa (*Carica papaya* L.) en las variedades de Tailandia y Maradol. Producción Agropecuaria/agroalimentaria, 3(1), 45-49.
- De Morais, P. L., G. C. Da Silva, J. B. Menezes, F. E. Maia, D. J. Dantas y R. S. Junior (2007). Pos-colheita de mamão híbrido. Revista Brasileira Fruticultura, 29, 666-670.
- Esquivel, M., Y. Tornet, R. E. Ramos, E. Farrés, A. González y M. C. Rodríguez (2008a). Caracterización y evaluación de dos híbridos de papaya Cubana. Agricultura técnica en México, 34, 333-339.
- Esquivel, M., Y. Tornet, R. E. Ramos, E. Farrés, J. Castro y M. C. Rodríguez (2008b). Evaluación de tres cultivares de papaya del grupo 'SOLO' basada en caracteres de crecimiento y productividad. Cultivos Tropicales, 29, 59-64.
- Ferraguetti, G. (2003). O primeiro Híbrido de mamão Formosa Brasileiro. Revista Brasileira Fruticultura, 29, 211-218.
- Fonseca, M., N. Rocha, S. Cenci, P. R. Cecon y R. E. Bressan (2003). Comparación entre las papayas Var. Sunrise Solo y Var. Golden durante siete estados de Madurez. Revista iberoamericana de tecnología poscosecha, 5(2), 86-91.
- Fisher, G., R. Flórez, D. Angel y R. Sora (2000). Producción, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. Universidad Nacional de Colombia. 175 p.

- Materano, W. J., J. Zambrano, A. Varela, I. Quintero, R. Alvarez y M. Maffei (2004). Efecto del escaldado en lechosa (*Carica papaya* L.) con mínimo procesamiento. Revista de la Facultad de Agronomía, 21, 343-350.
- Nagata, M., y I. Yamashita (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoides in tomato fruit. Journal Japanese Society Food Science Technology, 39(10), 925-928.
- Picha, D. (2006). Horticultural crop quality characteristics important in international trade. Acta horticulturae, 712, 423-426.
- Santamaría, R. F., S. E. Díaz, F. Espadas, J. M. Santamaría y A. Larqué (2009). Características de calidad de frutos de papaya Maradol en la madurez de consumo. Agricultura Técnica en México, 35, 347-353.
- Sañudo, B. A., C. J. Siller, E. T. Osuna, R. D. Muy, A. G. López y J. Labaitch (2008). Control de la maduración en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) con 1-metilciclopropeno y ácido 2-cloroetil fosfónico. Revista Fitotecnia Mexicana, 31, 141-147.
- UPOV, (2010). International union for the protection of new varieties of plants. Papaya UPOV Code: Caric_pap *Carica papaya* L. 32 p.
- Weatherall, L., y W. G. Lee (1991). Instrumental evaluation of some New Zealand fruit colours using CIELAB values. New Zealand Journal of Botany, 29, 197-205.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MATERIAL PARENTAL LÍNEA 7 (CRIOLLA), MARADOL 22 (COMERCIAL) Y SU PROGENIE F1 Y F2 MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES 'QTLs' ASOCIADOS AL TIPO SEXUAL DE FLOR, COLOR DE PULPA Y TAMAÑO DEL FRUTO EN *Carica papaya* L.

III.1 INTRODUCCIÓN

La colección y caracterización de germoplasma se ha basado tradicionalmente en evaluaciones de caracteres fenotípicos que suelen ser necesarias y útiles para la identificación de genes valiosos destinados a los programas de mejoramiento genético (Mondragón, 2001). Sin embargo, la colección extensiva y el mantenimiento del germoplasma son costosos, atribuyéndose como uno de los problemas más importantes de las colecciones *in vivo* (Kresovich *et al.*, 1993). Actualmente, la caracterización de algunas poblaciones de plantas se basa en la asociación entre variables de carácter agronómico y molecular para estimar la variabilidad existente en el conjunto de individuos que la conforman; de tal manera que la información codificada por los genes puede establecer su identidad morfológica (Franco e Hidalgo, 2003). Al respecto, (Demey *et al.*, 2003), reportan que aquellos estudios que incorporen descriptores morfológicos y marcadores moleculares proveerán una mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos.

Los marcadores moleculares desempeñan un papel cada vez más importante en el mejoramiento genético y han producido formas novedosas y potencialmente más eficiente para analizar y manipular las variaciones genéticas naturales que superan las limitaciones de los métodos de caracterización tradicionales (Martin, 2010). Esta metodología ha permitido identificar variabilidad en el ADN entre los cultivares y su contraparte, en germoplasma silvestre. En la actualidad se disponen de varios tipos de marcadores genéticos que difieren en su facilidad y rapidez de uso y en la cantidad de información que suministran (Paran y Michelmore, 1993). De tal manera que el avance en el conocimiento de la distribución de la variabilidad genética es de suma importancia para el rápido desarrollo de estrategias de conservación efectivas (Solano *et al.*, 2009).

Las técnicas de biología molecular y el uso de marcadores moleculares han permitido conocer, caracterizar y estimar la diversidad genética y las relaciones de muchos organismos vivos y las relaciones entre grupos de interés (Solano *et al.*, 2009). Cabe destacar que la caracterización molecular es independiente de la influencia del ambiente, es decir, que los marcadores moleculares que detectan polimorfismos a nivel del ADN tienen la ventaja de ser neutros frente al ambiente ya que poseen un mayor poder discriminatorio y son altamente reproducibles (Martínez *et al.*, 2006). Entre las técnicas basadas en marcadores moleculares más usadas para la caracterización genética de *Carica papaya* L. se han reportado los isoenzimas, RAPDs, AFLPs, ISSR y SSRs (Suresh, 1994; Kim *et al.*, 2002; Rajeswari, 2004; Blas, 2008; Esquivel *et al.*, 2009; Olivera *et al.*, 2011; Madarbokus y Ranghoo-Sanmukhiya, 2012; Vegas *et al.*, 2013; Sudha *et al.*, 2013), que han sido exitosas para detectar el polimorfismo presente en esta especie, con utilidad en la detección de nuevos QTLs, o conocer la segregación genética. El porcentaje de polimorfismo es muy importante ya que ayuda a detectar diferencias genéticas entre individuos a nivel de ADN, a través de un marcador genético, el cual es una banda de ADN que puede estar asociada a un gen que codifica para una característica cuantitativa de interés (Valadez y Kahl, 2000). Un marcador molecular ligado a caracteres de interés comercial 'QTL' (*quantitative trait loci* por sus siglas en inglés) constituye una herramienta muy útil para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético tradicionales; dando lugar a su implementación en la selección asistida por marcadores moleculares, a su vez, una disminución en gastos en tiempo y recursos en los estudios encaminados en la selección de genotipos elites (Valdés y Rodríguez, 2003).

Al respecto, (Blas, 2008) reportó 13 marcadores QTL asociados a características propias del fruto en *Carica papaya* L. tipo 'SOLO' como son color de pulpa, tamaño y forma del fruto. Con el uso de estos marcadores moleculares se busca iniciar un programa de selección asistida por marcadores moleculares, de tal manera que al correlacionarlo con la caracterización morfológica se precise la selección de ejemplares prometedores y útiles en programas de mejoramiento genético de la especie.

III. 2. HIPÓTESIS

La caracterización y validación de marcadores moleculares QTLs será útil para la selección asistida por marcadores moleculares (SAM/MAS) de aquellos individuos que presenten las características deseadas para su mejoramiento genético en el color de pulpa y tamaño del fruto dentro de las poblaciones F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 en *Carica papaya* L.

III.3. OBJETIVOS

III.3.1. Objetivo general

Validar el uso de marcadores moleculares QTLs asociados Al tipo sexual de flor y a la morfología del fruto en los parentales Criolla Línea 7, Maradol 22 y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 como plataforma de selección genética asistida por marcadores moleculares (SAM) en *Carica papaya* L.

III.3.2. Objetivos específicos

Estandarizar el protocolo de extracción de DNA (CTAB) en *Carica papaya* L. var. Maradol, además, las condiciones de PCR de los iniciadores que amplifican secuencias de QTLs asociados a caracteres morfológicos de flor y fruto de *Carica papaya* L. Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22.

Generar bioinformáticamente el tamaño de fragmento esperado de los marcadores moleculares QTLs como referencia electroforética.

Validar que la selección basada en datos moleculares corresponda efectivamente al tipo sexual de flor y a la morfología del fruto observada en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce L7xM22.

III.4. MATERIAL Y MÉTODOS

III.4.1 Material vegetal

El material vegetal evaluado fueron los parentales Criolla Línea 7 y Maradol 22, contrastantes en los caracteres de peso, longitud, diámetro del fruto (Figura 3.1 y Cuadro 3.1). Además, la población F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22. Después de ser caracterizados morfológicamente fueron caracterizados molecularmente en el Laboratorio de Fisiología Molecular de la unidad de Biotecnología del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, A.C. (CICY). Para efectuar el análisis molecular se colectaron muestras foliares de 42 individuos F1 y 165 individuos F2 establecidos en el vivero del CICY, e integrados dentro del Programa de Mejoramiento Genético de Papaya planteado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular de la Unidad de Biotecnología.

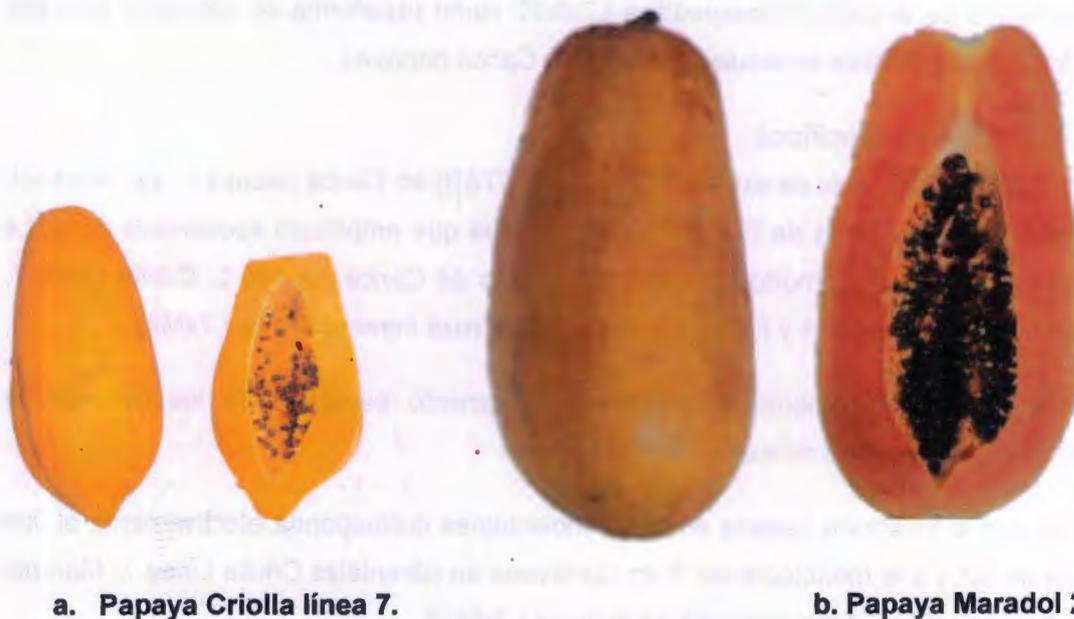


Figura 3.1. Parentales L7 y M22, papaya Criolla Línea 7(a) y Maradol 22 (b), con caracteres contrastantes en la morfología del fruto.

Cuadro 3.1. Características de los parentales contrastantes empleados para generar la población F1 y F2 de *Carica papaya* L.

Características	Criolla 7	Maradol 22
Sexo	Hermafrodita	Hermafrodita
Pulpa	Amarilla-naranja	Salmón (naranja-roja)
°Brix	13	11
Peso fruto (g)	400	2 230
Largo fruto (cm)	16	26.4
Diámetro fruto (cm)	7.5	13.3
Licopeno (mg.mL ⁻¹)	0.02	3.75
β -caroteno (mg.mL ⁻¹)	0.35	2.43

III.4.2 Extracción de ADN

Se colectaron hojas jóvenes de plántulas de papaya, tanto de los parentales como de la progenie F1 y F2. Para la colecta del material vegetal se procedió de la siguiente manera: las hojas se limpiaron con algodón y agua destilada, posteriormente se cortaron con una tijera previamente desinfectada con etanol al 99%, el tejido foliar se empaquetó en sobres de aluminio rotulados y se colocaron en contenedores con nitrógeno líquido, finalmente, las muestras fueron almacenadas en el ultracongelador a -80°C.

Se aplicó el protocolo de extracción de DNA propuesto por (Doyle y Doyle, 1990), con varias modificaciones. El cual se desarrolló con las actividades que se describen a continuación para una muestra: se pesó 0.2 g de tejido foliar fresco y fue liofilizado, se

colocó en un tubo eppendorf de 2 mL se le agregó 600 μ L de buffer de extracción al cual se le agregó 0.2% de β -mercaptoetanol y 2% de polivinilpirrolidona (PVP). La muestra se homogenizó por inversión y vortexeo, para luego proceder a la incubación de la misma a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se agregó 500 μ L de una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico, se agitó por inversión y se procedió a centrifugar la muestra a 13 500 g durante 15 minutos (repetir dos veces). En seguida se rescató el sobrenadante y se le agregó 400 μ L de isopropanol preenfriado y 45 μ L de acetato de sodio 3M, se agitó por inversión hasta observar una sola fase, luego se incubó a -20°C durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 13 500 g durante 20 minutos, y se descartó el sobrenadante para proseguir con dos lavados del precipitado con 300 μ L de etanol al 75% cada vez. Finalmente se dejó secar la pastilla de DNA durante 30 minutos en la campana de flujo laminar y la resuspensión se hizo con 50 μ L de agua ultrapura, enseguida se aplicó el tratamiento de incubación con RNAsa (3 μ L) a 37°C durante 15 minutos. El DNA extraído se almacenó a -80°C.

III.4.3 Cuantificación del ácido desoxirribonucleico (ADN)

Determinación espectrofotométrica: Para cuantificar la cantidad de DNA, la lectura debe hacerse a una longitud de onda de 260 nm, lo cual permite el cálculo de la concentración del ácido nucleico en la muestra evaluada. La relación entre la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm ($DO_{260/280}$) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de DNA tienen valores que van desde 1.8 a 2.0. Si existe contaminación con proteínas o fenol, el valor obtenido en esta relación puede ser significativamente diferente y la pureza no sería correcta. Es importante realizar también la medición a 230 nm ya que proporciona información valiosa adicional acerca de la pureza de la muestra, a esta longitud de onda se localiza la absorbancia mínima de ácidos nucleicos y la absorbancia máxima de enlaces peptídicos, lo cual es indicativo de contaminación por proteínas, presencia de compuestos orgánicos tales como solventes, o bien, alguna contaminación con amortiguador, ya que el TRIS o EDTA se absorben a esta longitud de onda.

La concentración de DNA se cuantificó en unidades de $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para cada muestra extraída en un espectrofotómetro NANODROP (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington U.S.A)

considerando las lecturas de absorbancia a las longitudes de onda de 260/280 y 260/230 por muestra.

III.4.4 Determinación de calidad del DNA en agarosa

La calidad del DNA se estimó mediante la electroforesis de una alícuota de 250 ng/ μ L de la muestra extraída en geles de agarosa. El DNA de alto peso molecular aparece como una banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos. El DNA fue visualizado a través de fluorescencia que emite el bromuro de etidio intercalado entre las cadenas de DNA de tal manera que al irradiar el gel de agarosa con luz UV se aprecia la ubicación y calidad de la molécula en cuestión. Así, se verificó la calidad del DNA extraído mediante la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, amortiguador TAE 1X y se tiñó con 0.8 μ L de bromuro de etidio. Se tomó 4 μ L de muestra de DNA, como amortiguador de carga se utilizó 1 μ L de azul de bromofenol, los cuales fueron mezclados perfectamente con la micropipeta. También se utilizaron 5 μ L de marcador molecular de 1 Kb diluido (1:10) que fue colocado en el primer carril de cada gel. Finalmente, la electroforesis se programó a 80 Volts, durante 60 minutos. El gel se observó en el analizador de imágenes GELDOC (BioRad), en el cual se documentó como imagen digital generada.

III.4.5 Amplificación con la técnica PCR

Se procedió a preparar la mezcla de reacción, la cual se inició con la adición de agua bidestilada, más el amortiguador al 1X, el cloruro de magnesio 2 mM y dNTPs 0.2 mM en un tubo de 1.5 mL, la mezcla se vortexeó para mayor disolución de los componentes y se mantuvo en hielo para evitar su degradación. En tubos de 0.2 mL previamente rotulados según la muestra a amplificar se procedió a colocar 0.2 μ M de cada marcador molecular QTL o molécula iniciadora del sentido y antisentido (Cuadro 3.2). Después se adicionó 5 ng de DNA molde extraído de los parentales contrastante y las poblaciones F1 y F2 de forma individual. Finalmente se agregó 0.5 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen) y se dio un pulso en el vortex para homogeneizar la muestra.

Una vez preparadas las reacciones y el previo calentamiento de termociclador se procedió a iniciar la amplificación de las moléculas específicas y asociadas a caracteres morfológicos de flor y fruto, además de la amplificación de marcador de sexo de la flor y color de pulpa del fruto en *Carica papaya* L. tanto en parentales Criolla Línea 7, Maradol

22, y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce interespecífica L7xM22. El programa de ciclos utilizados es especificado en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.2. Iniciadores de marcadores moleculares de DNA 'QTLs' usados en la amplificación por PCR asociados a caracteres del tipo sexual de flor y morfológicos del fruto en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 y F2 provenientes de la cruce interespecífica L7xM22.

CARÁCTER	MARCADOR	CÓDIGO	No. QTL
SEXO DE LA FLOR	CPM1815YC2	SEX_H.F	QTL:1
COLOR DE FRUTO	CPFC	COLOR_S.A	QTL:2
PESO DE FRUTO	P6K1472C0	PESO-1	QTL:3
	P6K268CC	PESO-2	QTL:4
	P3K1700CC	PESO-3	QTL:5
	ctg-43C0	PESO-4	QTL:14
	P3K2112K0	PESO-5	QTL:15
	CPM1556C0	PESO-6	QTL:16
	P3K4311bK0	PESO-7	QTL:17
LONGITUD DE FRUTO	CPM1573CC	LONG-1	QTL:8
	P3K6372CC	LONG-2	QTL:9
	P6K969CC	LONG-3	QTL:10
	P3K1568A5	LONG-4	QTL:11
	P3K1426C0	LONG-5	QTL:18
	P3K6947C0	LONG-6	QTL:19
DIÁMETRO DE FRUTO	ctg-268CC	DIAM-1	QTL:6
	CPM1550C0	DIAM-2	QTL:7
	CPM976aK0	DIAM-3	QTL:20
FORMA DE FRUTO	P6K268CC	FORM-1	QTL:12
	ctg-733A5	FORM-2	QTL:13
	P3K3187C0	FORM-3	QTL:21
	P3K2426aK3	FORM-4	QTL:22

Cuadro 3.3. Programa utilizado en el termociclador para la amplificación de marcadores moleculares de DNA 'QTLs' asociados a caracteres caracteres del tipo sexual de flor y morfológicos del fruto en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22, y progenie F1 y F2 provenientes de la crusa interespecífica L7xM22.

ETAPAS	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)
PREDES NATURALIZACIÓN	1 ciclo	3 minutos	95
DES NATURALIZACIÓN	35 ciclos	40 segundos	95
ALINEAMIENTO		35 segundos	58, 60, 65
EXTENSIÓN		1 minuto	72
EXTENSIÓN FINAL	1 ciclo		72
ALMACENAMIENTO			4

III.4.6 Electroforesis del producto PCR

Se procedió a realizar la electroforesis de cada muestra derivada de la técnica de PCR mediante las siguientes condiciones: gel de agarosa al 5% mezclado con amortiguador TBE 0.5 X; teñido con 0.8 µL de bromuro de etidio, se empleó 4 µL del producto PCR más 1 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol). Además, se colocó en un carril del gel una muestra de marcador de peso molecular conocido como 50 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen). El gel se visualizó en el analizador de imágenes GELDOC, en el cual se capturó una imagen digital para verificar la calidad, presencia y tamaño del amplicón de cada marcador empleado.

III.5. RESULTADOS

III.5.1 Extracción y cuantificación de DNA genómico

Mediante la cuantificación por espectrofotometría se obtuvo una relación 260/280 de 1.8 en promedio, es decir la calidad y pureza del DNA fueron adecuadas para todas las muestras evaluadas. La concentración de DNA varió desde 256 a 839.2 ng.μL⁻¹ por lo que las muestras se diluyeron para mantener una concentración de 250 ng.μL⁻¹ en un volumen total de 50 μL. Mismas que fueron visualizadas en un gel de agarosa al 0.8% como se aprecia en la Figura 3.2.



Figura 3.2. Electroforesis del DNA extraído de parentales Criolla L7, Maradol 22, y progenie F1 (a) y F2 (b, c, d) provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22. MM: marcador molecular de 1 Kb.

El método de extracción de DNA con modificaciones optimizadas para este estudio, requirió solo dos horas para la extracción de 150 muestras. El DNA stock obtenido se mantuvo por varios meses sin degradarse, y las extracciones posteriores fueron innecesarias.

III.5.2 Marcador molecular CPM1815YC2: identificación de sexo de *Carica papaya* L.

El tamaño del fragmento esperado del marcador molecular CPM1815YC2 que predijo el programa bioinformático pfectBLAST (Santiago y Ramírez, 2012) fue de 167 pb. No obstante este marcador molecular ligado al tipo sexual de *Carica papaya* L. amplificó una doble banda o una sola banda, dependiendo del tipo de planta analizada. El tamaño de amplicón en genotipos con doble banda corresponde a 175 y 195 pb, respectivamente, mientras que en genotipos con una sola banda fue de 190 pb (Figura 3.3). Los datos anteriores son muy cercanos a los reportados por (Ma *et al.*, 2004) en *Carica papaya* L. Kapoho, SunUp y progenie F2, cuyo valor fue de 200 y 204 pb.

En la Figura 3.4 se aprecian que los parentales Criolla Línea 7 y Maradol 22 presentaron doble banda amplificada, ya que ambos son plantas hermafroditas; de la misma manera se presentó en 28 genotipos F1. En los 14 individuos F1 restantes se apreció una sola banda correspondiente a plantas de sexo femenino. En la progenie F2 generada por la autopolinización de H90B, H77B y H70B se presentaron 35, 40 y 39 genotipos con doble banda, y 19, 14 y 15 genotipos con una sola banda amplificada, respectivamente (Figura 3.5).

Lo anterior coincide con lo reportado por (Chen *et al.*, 2007) quienes probaron este marcador molecular en materiales de papaya Hawaiana e identificaron como genotipo femenino y hermafrodita a AU9 y Sunup, con una y doble banda respectivamente.

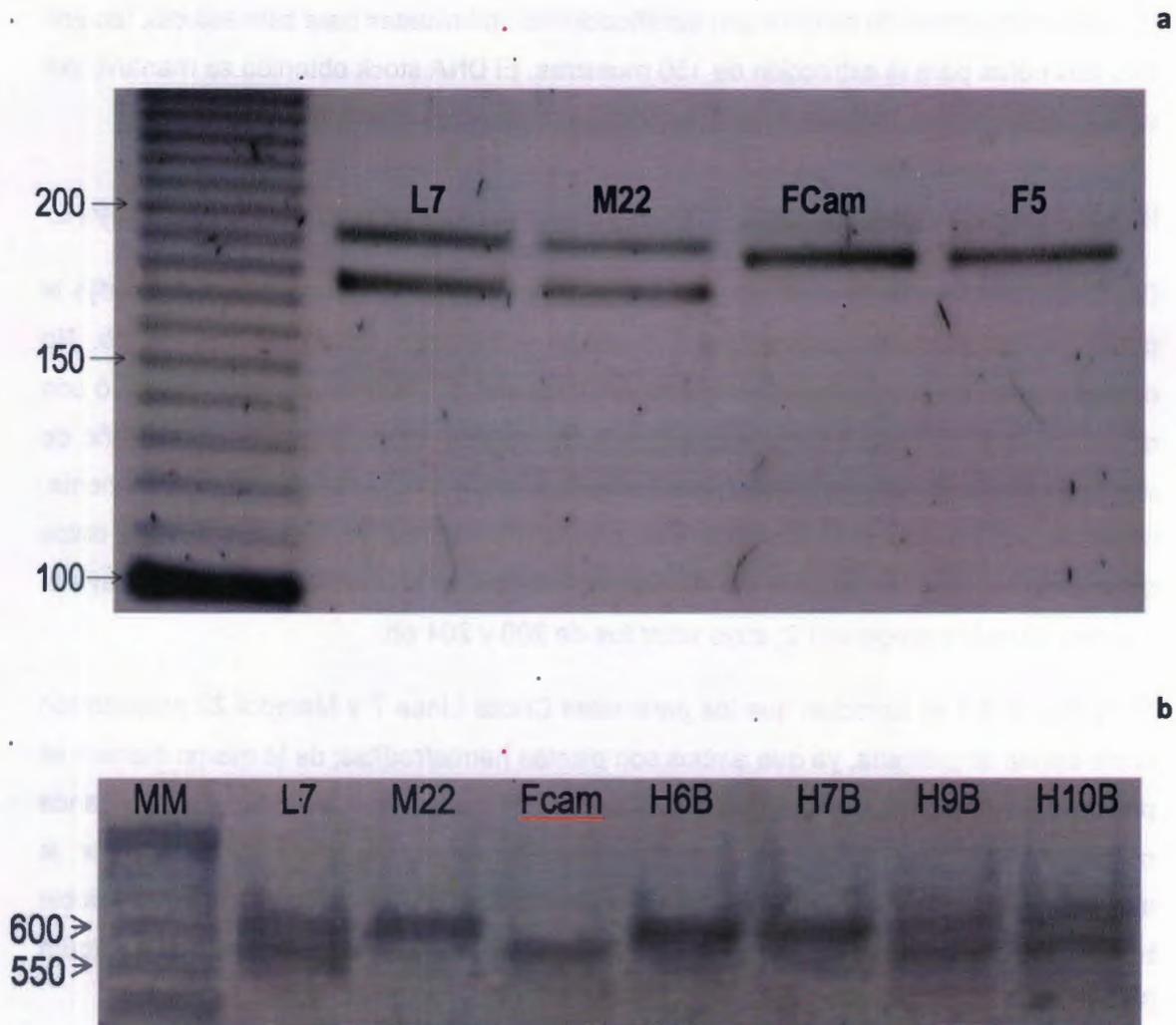


Figura 3.3 Marcador molecular de sexo CPM1815YC2 (a) amplificado en parentales Criolla Línea 7, Maradol 22 y dos plantas femeninas de *Carica papaya* L. (Fcam y F5). Marcador molecular de color de pulpa CPFC1 (b) amplificado en los parentales L7 y M22, Fcam, y H6B, H7B, H9B, H10B. L7: parental Criolla Línea 7, M22: parental Maradol 22, Fcam: planta silvestre femenina y pulpa amarilla clara, F5: planta femenina y H6B, H7B, H9B, H10B: plantas hermafroditas, ambas, progenie F1 proveniente de la cruce intraespecifica L7xM22. Electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 10 pb y 50pb, respectivamente.

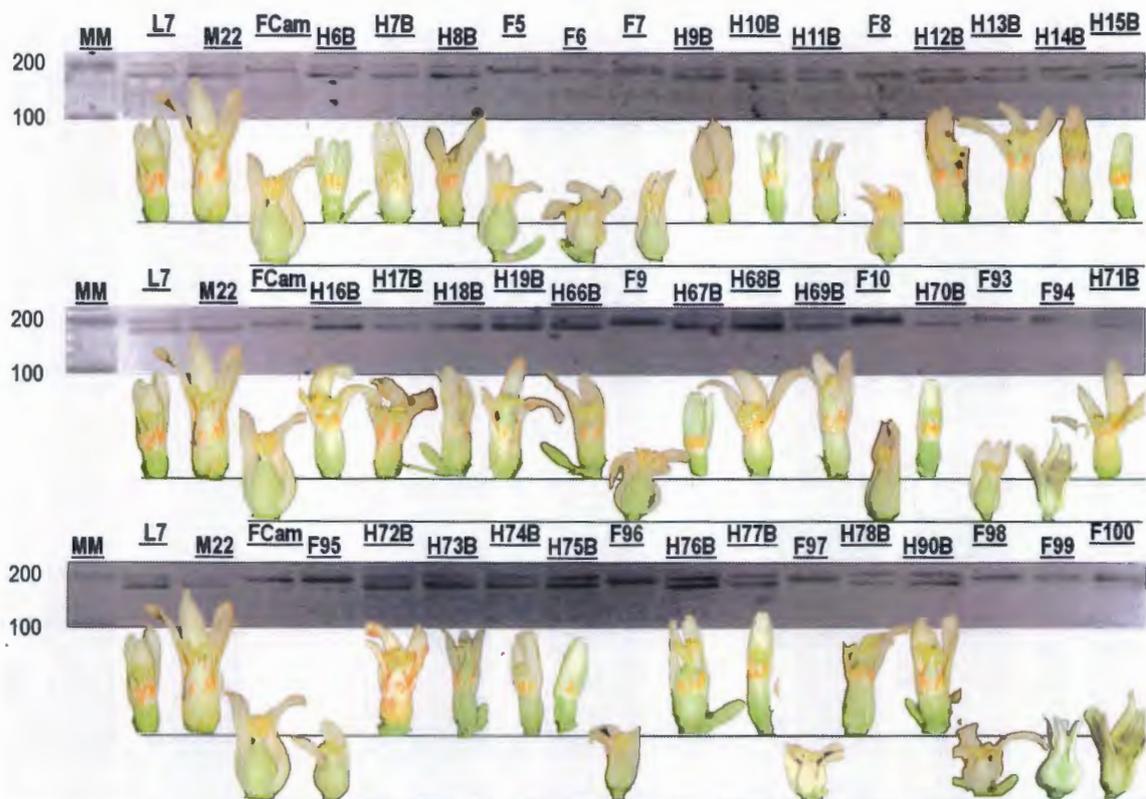


Figura. 3.4. Electroforesis del marcador molecular de sexo amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F1 provenientes de la cruce L7x M22 de *Carica papaya* L. L7: población Criolla línea 7, M22: Maradol 22, H: plantas hermafroditas, F: plantas femeninas en gel de agarosa al 5% teñido con bromuro de etidio.

En cuanto a la representación alélica observada se ha reportado que plantas masculinas y hermafroditas son heterocigotas obligadas y sus alelos son dominantes sobre el alelo femenino, lo que les confiere los genotipos M1m y M2m respectivamente, esta característica quizá sea la causa de que también plantas de sexo masculino presenten doble banda amplificada (dato no mostrado), en tanto, las plantas femeninas son las únicas homocigotas recesivas con un genotipo mm como se obtuvo en los genotipos F1 y F2 evaluados en esta investigación.

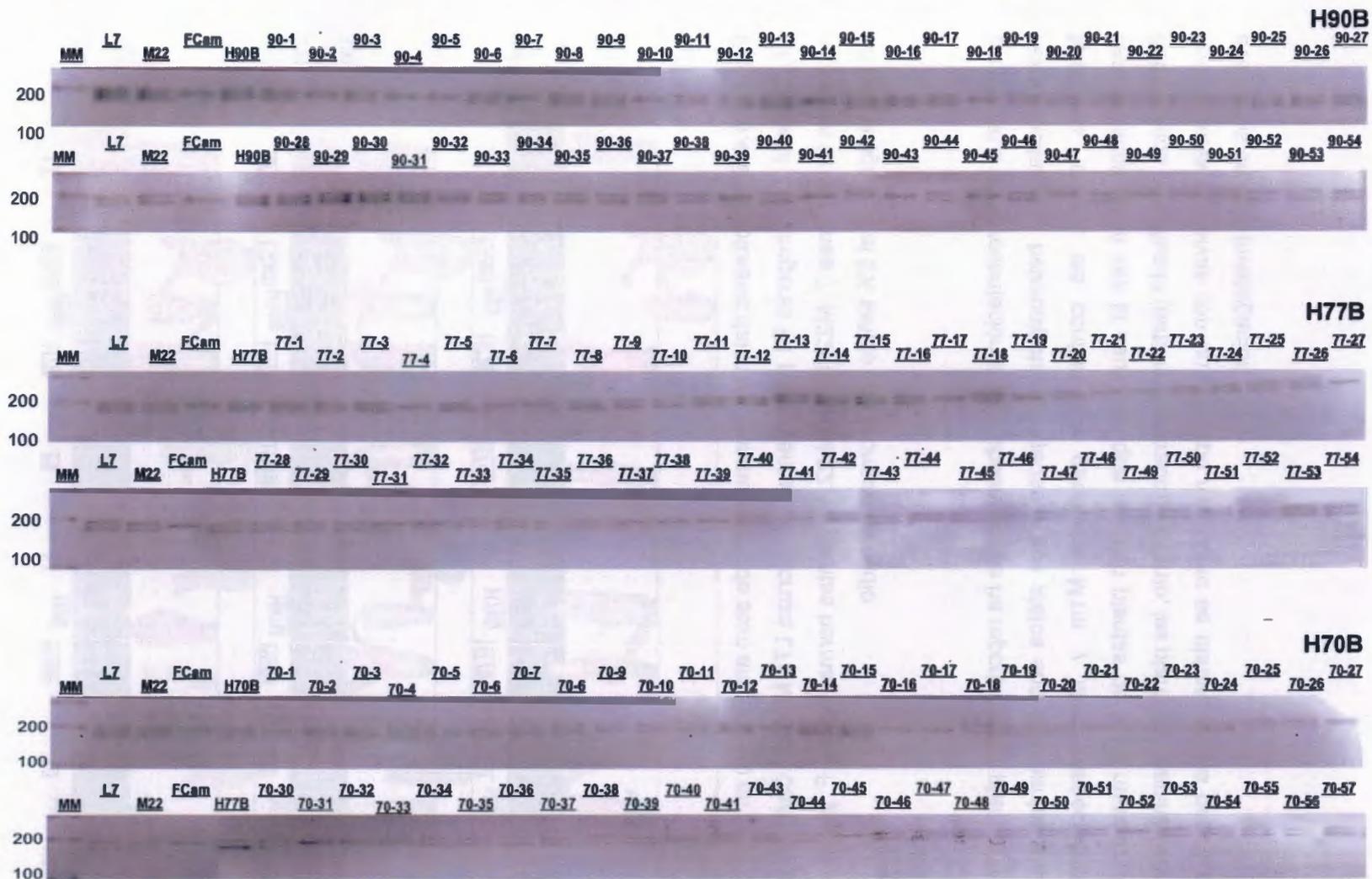


Figura 3.5. Electroforesis de marcador molecular de sexo amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F2 provenientes de la autopolinización de H90B, H77B y H70B en *Carica papaya* L.

La segregación de una planta hermafrodita autofecundada sigue una relación 2:1 (hermafroditas: femeninas) (Mora y Bogantes, 2005), dato que coincide con lo obtenido en este trabajo de investigación ya que de 42 plantas en la F1, 66.6% son hermafroditas y 33.3% son femeninas (relación 2:1) en la progenie F1. Mientras que en la progenie F2 obtenida de la autopolinización de H70B, H77B y H90B presentaron por un lado 72.2%, 74.4% y 64.8% de condición hermafrodita, y 27.8%, 25.9% y 35.2% de condición femenina, respectivamente.

III.5.3 Marcador molecular CPFC1: identificación de color de *Carica papaya* L.

Para el marcador molecular de color de pulpa CPFC el análisis mediante el software perfectBLAST (Santiago y Ramírez, 2012) arrojó un tamaño de amplicón esperado de 568 pb. Se caracterizaron 28 plantas F1 provenientes de la cruce L7xM22, además 54 plantas F2 provenientes de H70B, 54 plantas F2 provenientes de H77B y 54 plantas F2 provenientes de H90B quienes fueron sometidas al análisis con el marcador molecular de color CPFC1. En la Figura 3.6 se observan las bandas de amplificación de este marcador, donde el parental M22 cuya característica fenotípica es de poseer pulpa naranja-rojizo y 13 genotipos F1 presentaron una sola banda con tamaño de 600 pb, cuya condición alélica es homocigota recesiva. El parental L7, el cual posee pulpa amarilla y 15 individuos F1 presentaron doble banda una de 600 pb y otra de 550 pb, característica alélica de genotipos heterocigotos. Además, se analizó un material silvestre (FCam) con color de pulpa amarilla claro y se observó una banda de 550 pb, es decir, su condición alélica es homocigota dominante (Figura 3.3b). En general, en la progenie F2 se aprecia que en los tres grupos formados el alelo recesivo de color (naranja rojizo) ha sido fijado en un 100% para los genotipos F2 provenientes de H90B, en un 98.1% para los genotipos F2 provenientes de H70B y en 92.6% para los genotipos F2 provenientes de H90B (Figura 3.7). Cabe resaltar que en la población F2 provenientes de H70B, el genotipo H70-57 presentó condición heterocigota segregante del parental L7, por otra parte, en la población F2 provenientes de H77B, los genotipos H77-12, H77-54, y H77-52, presentaron condición heterocigota segregante del parental L7 y solamente el genotipo H77-42 presentó condición homocigota dominante semejante a la que presenta la FCam.

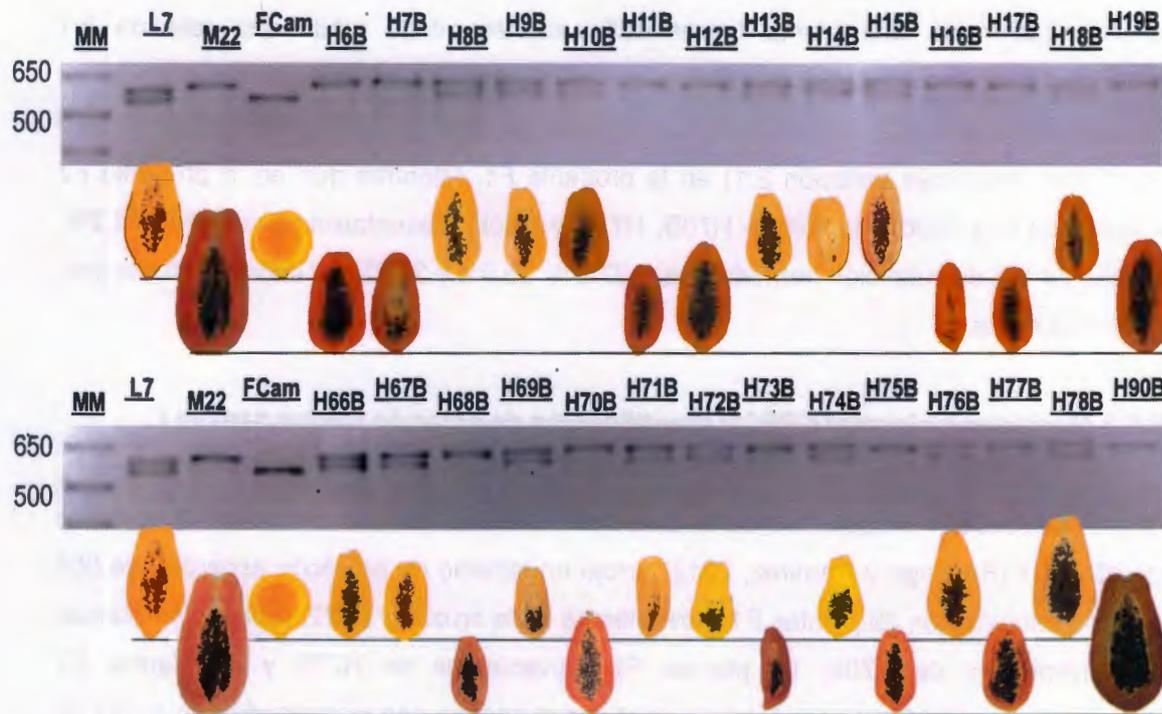


Figura. 3.6. Electroforesis del marcador molecular de color de pulpa amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F1 proveniente de la cruce L7x M22 de *Carica papaya* L. L7: población Criolla línea 7, M22: Maradol 22, H: plantas hermafroditas. Gel de agarosa al 5% teñido con bromuro de etidio. MM: 1Kb.

Con los datos moleculares de color de pulpa se pudo aseverar que el parental L7 utilizado para generar la cruce L7xM22 esta hibridizado. Dado que el parental L7 es heterocigoto al ser cruzado con Maradol 22 se realizó una retrocruza con la que se integro de manera confiable el gen de interés relacionado con el color de pulpa naranja rojizo.



Figura 3.7. Electroforesis de marcador molecular de color amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F2 provenientes de la autopolinización de H90B, H77B y H70B en *Carica papaya* L. MM: 1Kb.

III.5.4 Marcadores moleculares QTLs asociados al fruto de *Carica papaya* L.

III.5.4. 1 Obtención de fragmento esperado de 'QTLs' *in silico*.

El análisis mediante el software *prfectBLAST* (Santiago y Ramírez, 2012) predijo el tamaño de amplicón esperado cuyos resultados se presentan en el Cuadro 3.4 siguiente:

Cuadro 3.4. Tamaño de fragmento esperado para 11 marcadores moleculares QTL asociados a caracteres morfológicos del fruto de papaya obtenidos mediante software *prfectBLAST*.

CARÁCTER	MARCADOR	CÓDIGO	No. QTL	Producto
PESO DE FRUTO	P6K1472C0	<i>PESO-1</i>	<i>QTL:3</i>	156
	P6K268CC	<i>PESO-2</i>	<i>QTL:4</i>	154
	P3K1700CC	<i>PESO-3</i>	<i>QTL:5</i>	110
	ctg-43C0	<i>PESO-4</i>	<i>QTL:14</i>	131
	P3K2112K0	<i>PESO-5</i>	<i>QTL:15</i>	173
	CPM1556C0	<i>PESO-6</i>	<i>QTL:16</i>	158
	P3K4311bK0	<i>PESO-7</i>	<i>QTL:17</i>	176
LONGITUD DE	CPM1573CC	<i>LONG-1</i>	<i>QTL:8</i>	84
	P3K6372CC	<i>LONG-2</i>	<i>QTL:9</i>	-
	P6K969CC	<i>LONG-3</i>	<i>QTL:10</i>	153
	P3K1568A5	<i>LONG-4</i>	<i>QTL:11</i>	-
	P3K1426C0	<i>LONG-5</i>	<i>QTL:18</i>	84
	P3K6947C0	<i>LONG-6</i>	<i>QTL:19</i>	102
DIÁMETRO DE	ctg-268CC	<i>DIAM-1</i>	<i>QTL:6</i>	145
	CPM1550C0	<i>DIAM-2</i>	<i>QTL:7</i>	158
	CPM976aK0	<i>DIAM-3</i>	<i>QTL:20</i>	120
FORMA DE FRUTO	P6K268CC	<i>FORM-1</i>	<i>QTL:12</i>	154
	ctg-733A5	<i>FORM-2</i>	<i>QTL:13</i>	138
	P3K3187C0	<i>FORM-3</i>	<i>QTL:21</i>	-
	P3K2426aK3	<i>FORM-4</i>	<i>QTL:22</i>	132

El tamaño de fragmento esperado obtenido *in silico* fue desde 84 pb a 176 pb para los marcadores de DNA 'QTLs' tipo SSR, el cálculo se basó en los datos del valor *e*, *subject id*, *alignment length*, *subject id star* o *subject id end* reportados en el Cuadro 3.5 (Anexo 1)

Es decir, aquellos SSR con valores de e cercanos a cero, un alineamiento de iniciadores del 100% de identidad y una posición del forward y reverse en la misma accesión favoreció la predicción del tamaño de fragmento esperado. Para los marcadores 'QTLs' P3K6372CC, P3K1568A5 y P3K6947C0 no se pudo calcular el tamaño de fragmento esperado ya que los datos de salida del software no fueron los aceptados.

III.5.4.2 Selección de marcadores de DNA 'QTLs' asociados a morfología de flor y fruto en *Carica papaya* L.

La estandarización de las condiciones de PCR favoreció la amplificación de los 20 marcadores de DNA 'QTLs' en los progenitores contrastantes, Criolla Línea 7 y Maradol 22. Para ello fue necesario probar un gradiente de temperaturas en todos los marcadores de DNA 'QTLs' como se muestra en la Figura 3.8a, mismo que fue determinado con base al valor de T_m recomendada por el proveedor. En la Figura 3.9 los fragmentos amplificados de acuerdo al gradiente de T_m aplicado, la identificación del mejor fragmento amplificado y su T_m correspondiente permitió ordenar a los QTLs en tres grupos reportados en la Figura 3.8b.

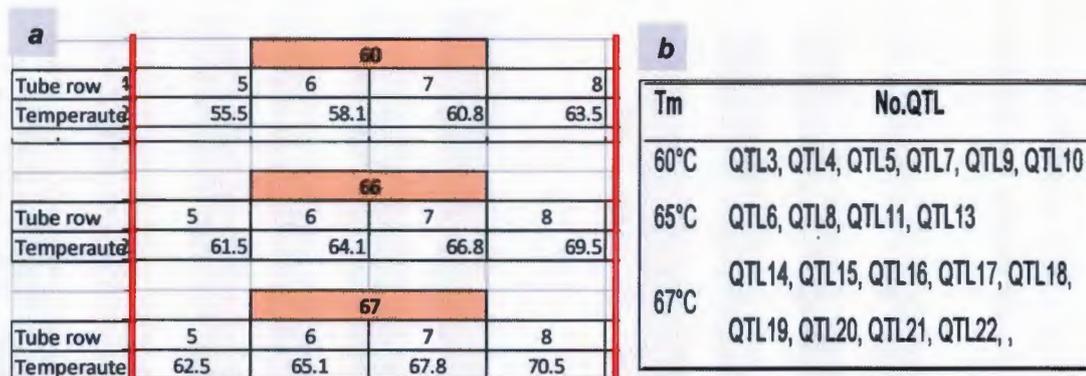


Figura 3.8. Programa de T_m para la prueba de gradientes de temperatura (a) y grupos formados por QTLs que comparten la misma T_m de alineamiento en PCR (b).

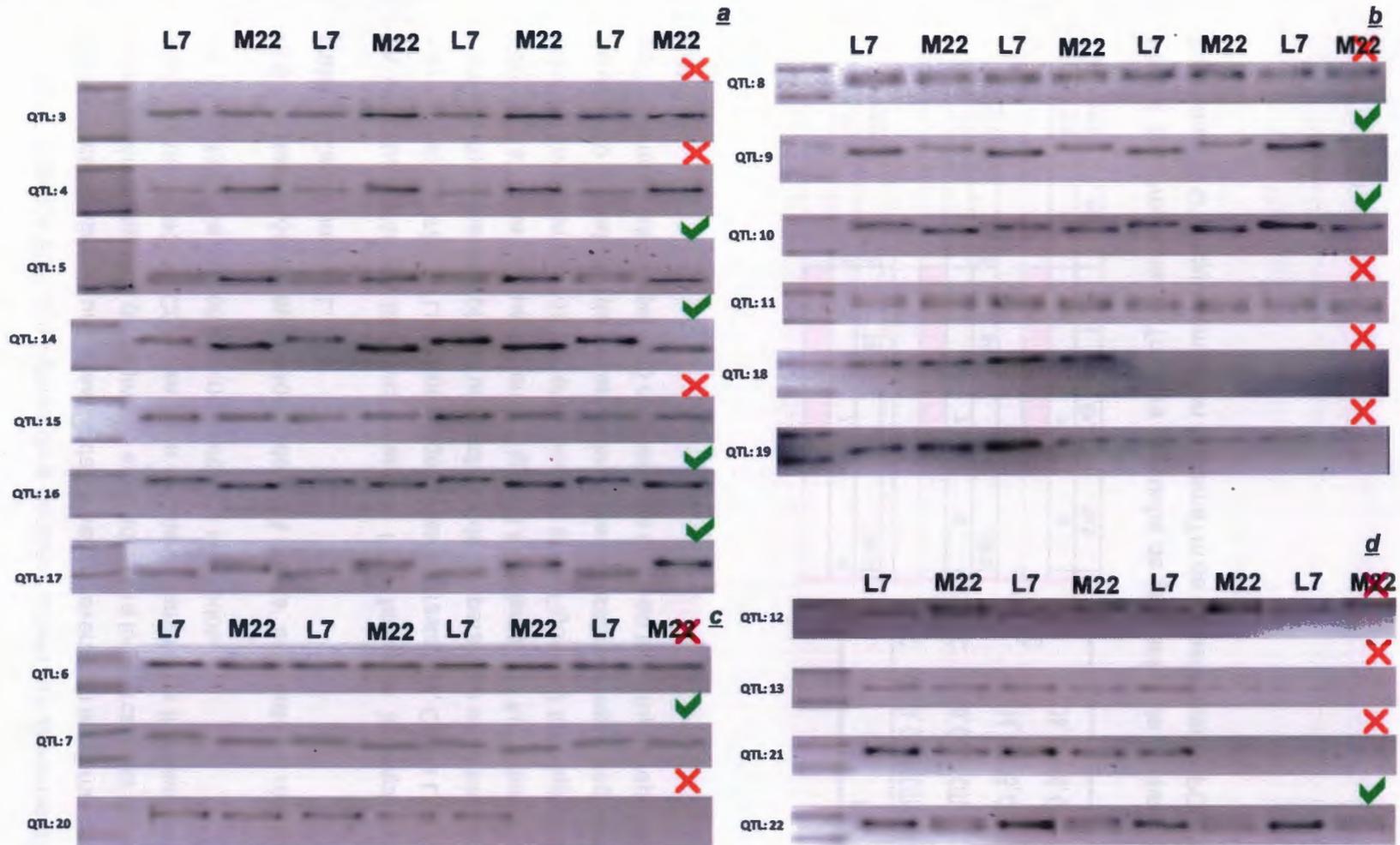


Figura 3.9. Electroforesis de los marcadores moleculares QTLs asociados a la morfología del fruto amplificadas en parentales Criolla L7 y Maradol 22 de *Carica papaya* L. *a*: QTLs-peso de fruto, *b*:QTLs-longitud de fruto, *c*:QTLs-diámetro de fruto, *d*:QTLs-forma del fruto.

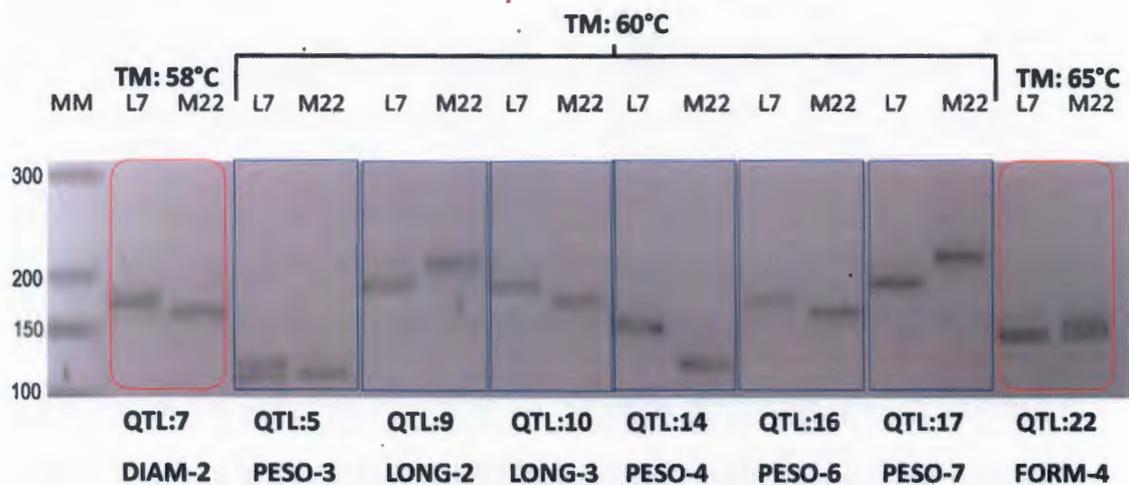


Figura 3.10. Electroforesis de los marcadores moleculares QTLs polimórficos seleccionados y asociados a la morfología del fruto amplificados en parentales Criolla Línea 7 y Maradol 22 de *Carica papaya* L. L7: Criolla L7, M22: Maradol 22, MM: marcador molecular 50 pb.

Además, se detectó polimorfismo solo en ocho marcadores de DNA 'QTLs' en los parentales contrastantes, Criolla Línea 7 y Maradol 22, dato importante al momento de aplicar estos QTLs en la progenie F1 y F2 provenientes de la cruce interespecífica L7xM22. Los QTLs asociados a peso de fruto seleccionados fueron QTL5, QTL14, QTL16 y QTL17. Los asociados a longitud de fruto fueron QTL9 y QTL10. Mientras que para el diámetro y forma de fruto los QTL7 y QTL22 fueron seleccionados, respectivamente (Figura 3.9).

Los ocho QTLs polimórficos entre los parentales contrastantes L7 y M22, se sometieron a la amplificación de Tm seleccionada, solamente el QTL5, QTL9 y QTL10 mantuvieron amplificados de calidad nítida, mientras que el QTL7, QTL14, QTL16, QTL17 y QTL22, tuvieron problemas para amplificar el fragmento esperado (dato no mostrado), de tal manera que se tomó el valor de Tm inferior a la que se había elegido inicialmente, y con ello se mejoró la amplificación de los mismos, finalmente el QTL7 tuvo mejor amplificado a una Tm de 58°C y el QTL22 a una Tm de 65°C, el resto de los QTL a una Tm de 60°C (Figura 3.10). Los tamaños de fragmentos visualizados y obtenidos en estos QTLs son muy aproximados a la generados previamente con el software perfectBlast (Santiago y Ramírez, 2012), el cual arrojó para el QTL5. QTL7, QTL10 QTL14 QTL16 QTL17 y QTL22 fragmentos

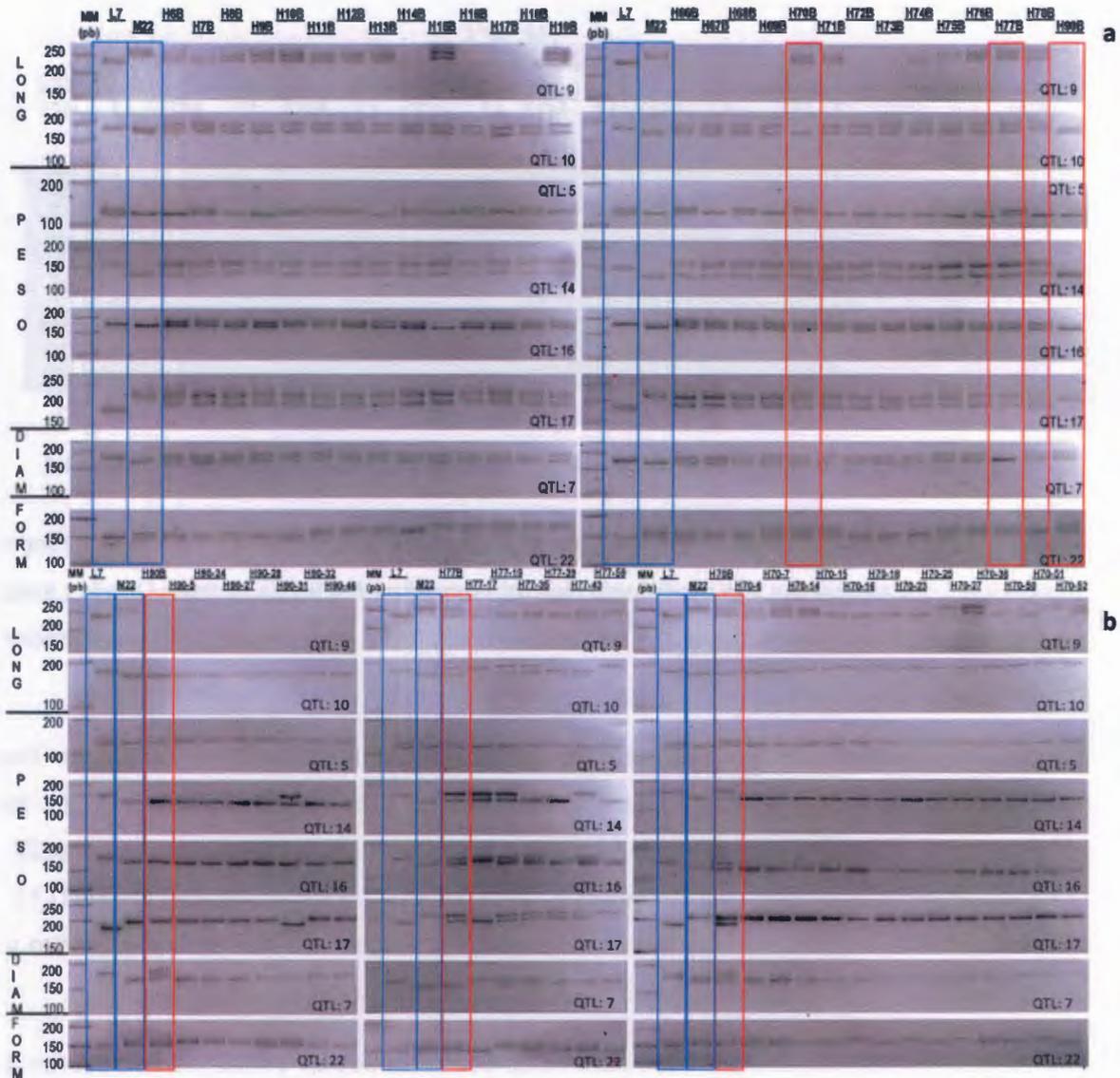


Figura 3.11. Electroforesis de marcadores moleculares QTLs asociados a la morfología del fruto amplificadas en parentales Criolla Línea 7 y Maradol 22 de *Carica papaya* L. y su progenie F1(a) y F2 (b).

de 110 pb, 158 pb, 153 pb, 131 pb, 158 pb, 176 pb y 132 pb, respectivamente, Sin embargo con la caracterización molecular en laboratorio se apreció la condición alélica de cada QTL, donde QTL7, QTL9, QTL10 QTL14 QTL16 y QTL17 fueron homocigotos segregantes de los parentales L7 o bien de M22, mientras que el QTL5 y QTL22 presentaron condición heterocigoto en uno de los parentales.

Con la finalidad de explorar la herencia genética segregante de los parentales L7 y M22 los ocho QTLs asociados a la morfología de fruto de *Carica papaya* L. fueron aplicados en la progenie F1 y F2 proveniente de la crusa interespecífica L7xM22 como se muestra en la Figura 3.11 a, b.

La condición alélica homocigota de los marcadores QTLs en los genotipos parentales L7 y M22 evaluados permitió visualizar una condición alélica heterocigota en la progenie F1. Al respecto, los resultados obtenidos reflejan que con los QTL7, QTL14 y QTL17 se caracterizó molecularmente un 96.4% de la población F1 como heterocigotos, con los QTL10 y QTL16 la proporción de genotipos F1 heterocigotos fue de 92.8%.

Cuando se da una crusa entre un individuo heterocigoto con otro homocigoto se esperan dos formas alélicas en su progenie en proporción 1:1. Al respecto, el QTL5 caracterizó a L7 como heterocigoto y a M22 como homocigoto, la crusa de ambos generó 17 genotipos heterocigotos y 11 genotipos homocigotos. Y el QTL22 caracterizó a L7 como homocigoto y a M22 como heterocigoto, la crusa de ambos generó 17 genotipos homocigotos y 11 genotipos heterocigotos. La caracterización molecular con el QTL9 en progenie F1 no fue la esperada ya que ese QTL caracterizó a los parentales L7 y M22 como homocigotos, no obstante en la F1 solo el 60.7% de la población mostró condición alélica heterocigota, pero en el 39.3% restante no se apreció alelo alguno.

La caracterización molecular con los mismos QTLs se enfocó a subpoblaciones F2 derivadas de autopolinizaciones de tres genotipos F1, H90B, H77B y H70B, provenientes de la crusa interespecífica L7xM22. La condición alélica del genotipo F1 H90B fue homocigoto con los QTL10, QTL5, QTL14, QTL16, QTL17. La presencia alélica en su progenie F2 mostró fijación del alelo homocigoto segregante del progenitor H90B en todos los genotipos caracterizados solo con los QTL5, QTL10 y QTL16, mientras que con el

QTL14 y QTL17 mostraron una forma alélica no esperada en el genotipo H90-31, pero el resto de los individuos presentaron condición alélica homocigoto segregante del progenitor H90B con estos QTLs. El genotipo H90B se caracterizó como heterocigoto con el QTL7 y QTL22, bajo esta condición se esperan tres formas alélicas en la progenie F2, sin embargo, el QTL7 caracterizó a todos los genotipos F2 provenientes de H90B con una forma alélica segregante del genotipo M22, con el QTL22 se pudo observar las tres condiciones alélicas, la homocigota segregante de L7, la heterocigota segregante de H90B (F1) y la homocigota segregante de M22. Como se esperaba la progenie F2 de H90B caracterizada por el QTL9 no mostró ninguna forma alélica.

El genotipo F1 H77B mostró una forma alélica homocigota solo con el QTL7, pero la presencia alélica en su progenie F2 no fue la esperada. Este mismo genotipo se caracterizó como heterocigoto con el QTL5, QTL9, QTL10 QTL14 QTL16, QTL17 y QTL22, donde las tres formas alélicas esperadas en la progenie F2 se encontraron presentes. Con el QTL10 el genotipo F1 H70B mostró una forma alélica homocigota, la presencia alélica en su progenie F2 fue la esperada ya que todos los genotipos F2 se caracterizaron con el alelo segregante del progenitor. Este mismo genotipo se caracterizó como heterocigoto con el QTL5, QTL7, QTL9, QTL14 QTL16, QTL17 y QTL22, sin embargo, se observó una fijación del alelo segregante de M22 con la mayoría de los QTLs evaluados, excepto el QTL22, el cual mostró las tres formas alélicas esperadas en la progenie F2 de H70B.

La validación de marcadores de DNA 'QTLs' en esta investigación arrojó los resultados comparativos entre los molecular y morfológico (Figura 3.11, Figura 3.12 y Figura 3.13).

El QTL9 asociado a la longitud de fruto (LF) en *Carica papaya* L. no mostró la forma alélica esperada en la progenie F1 proveniente de la cruce L7xM22. Se observó que solo el 60.7% de esta población fueron heterocigotos, mientras que el 39.3% no mostró ninguna forma alélica. Los individuos que fueron molecularmente heterocigotos no mostraron una morfología esperada ya que solo 10 individuos tuvieron una LF intermedia entre sus parentales L7 (16 cm) y M22 (27 cm), y los 7 individuos restantes mostraron una LF inferior al del parental L7. La condición alélica del QTL9 en las subpoblaciones F2 derivadas de los genotipos F1 H90B, H77B y H70B fue la esperada. La progenie F2 proveniente de H90B no mostró la presencia de alelos, mientras que la progenie F2 proveniente de H77B y H70B mostraron las tres formas alélicas esperadas. Dentro de la progenie F2 derivada de H77B

los genotipos H77-19 y H77-35 segregaron la forma alélica de L7, pero morfológicamente presentaron LF superiores al del progenitor H77B, mientras que H77-43 segregó la forma alélica del progenitor H77B y una LF (23.5 cm) próximo a M22. Por otro lado, dentro de la progenie F2 resultante de H70B los genotipos H70-15 y H70-18 segregaron la forma alélica de L7, pero morfológicamente estos genotipos F2 presentaron LF (25 cm y 24 cm, respectivamente) muy cercanos a M22. La relación molecular y morfológica resultó contrariada en estos genotipos F2, por lo tanto el QTL9 se descartó como posible marcador molecular útil en la selección asistida por marcadores (SAM) asociado a la LF de *Carica papaya* L. var. Maradol.

Otro QTL asociado a la LF fue el QTL10 con el que se obtuvo la forma alélica heterocigota esperada en 92.8% de la progenie F1. La proporción restante de la F1 fue representada por los genotipos H90B y H70B, los cuales segregaron la forma alélica del parental M22, sin embargo, estos individuos morfológicamente mostraron LF contrastante (19.8 cm y 15.5 cm, respectivamente). La progenie F2 proveniente de H90B mostró la presencia alélica homocigota esperada segregante de H90B y M22, no obstante, el genotipo F2 H90-5, morfológicamente presentó un valor de LF inferior al del parental L7 (16 cm). Dentro de la progenie F2 proveniente del individuo heterocigoto H77B se apreciaron las tres formas alélicas esperadas, particularmente se analizó la relación molecular y morfológica del genotipo F2 H77-39, el cual segregó la forma alélica del parental M22, sin embargo la LF (13 cm) indicó que morfológicamente es inferior a los parentales H77B y L7. La progenie F2 proveniente de H70B también mostró la presencia alélica homocigota segregante esperada de H70B y M22, aparentemente en esta población F2 proveniente de H70B hubo una asociación entre los datos moleculares y morfológicos, ya que estos presentaron frutos muy semejantes a M22 en LF. La constancia de datos moleculares y morfológicos contrastantes presentes en algunos genotipos dentro de la F1 (H70B y H90B) y F2 (H90-5 y H77-39) permitió que el QTL10 fuera descartado como posible marcador molecular útil en la selección asistida por marcadores (SAM) asociado a la LF de *Carica papaya* L. var. Maradol.

La segregación alélica con el marcador QTL5 asociado al peso de fruto (PF) fue la esperada, en una proporción aproximada de 1:1 dentro de la progenie F1, en la que 17 individuos fueron homocigotos segregantes de M22 y 11 individuos fueron heterocigotos como L7. Los genotipos F1 H10B y H19B resaltan por su caracterización molecular y

morfológica contradictoria, donde H10B fue segregante homocigoto de M22 y morfológicamente tuvo un PF máximo de 438 g, mientras que H19B fue segregante heterocigoto como L7 y morfológicamente tuvo un PF máximo de 1266 g. La segregación alélica homocigota dentro de progenie F2 derivada de H90B y M22 con el QTL5 fue la esperada, sin embargo se detectó que el genotipo F2 H90-31 tipificado como segregante homocigoto de M22, morfológicamente fue más parecido a L7. En toda la progenie F2 proveniente de H77B y de H70B solo se apreció la forma alélica homocigota segregante del progenitor M22, sin embargo se obtuvieron datos fenotípicos de 581.2 g, 525.9 g y 371.7 g de PF para los genotipos H77-35, H77-39 y H70-7, respectivamente. Por lo tanto, el QTL5 no es útil para la selección molecular del carácter peso de fruto en *Carica papaya* L. var. Maradol.

En general los QTL14, QTL16 y QTL17 asociados al PF mostraron mayor número de individuos heterocigotos dentro de la progenie F1 proveniente de L7xM22, correspondiendo el 96.4%, 92.8% y 96.4%, respectivamente. Según los datos morfológicos de PF, con excepción del genotipo F1 H10B, el 96.4% de la progenie F1 mostró un PF intermedio entre los parentales L7 (400 g) y M22 (2230 g). Cabe resaltar que el genotipo F1 H90B mostró una segregación alélica homocigota semejante al parental M22 con los tres QTLs anteriores. El análisis molecular en la progenie F2 proveniente de H90B mostró que con el QTL16 se obtuvo la segregación homocigota esperada en todos los genotipos F2, mientras que con los QTL14 y QTL17 la segregación homocigota fue la esperada solo en seis genotipos F2, y de forma no esperada en el genotipo F2 H90-31. Morfológicamente los seis genotipos F2 provenientes de H90B mostraron valores de PF superiores al de su progenitor H90B (825.5 g) y cercanos al de M22 (2230 g), solo el genotipo F2 H90-31 tuvo un PF de 776.1 g quedando por debajo del PF de H90B.

En todos los genotipos F2 provenientes de H70B se observó una segregación homocigota del parental H70B y M22 con los QTL14 y QTL17. Con el QTL16 solo se apreció la forma alélica homocigota segregante de M22, ningún individuo mostró la forma alélica homocigota segregante de L7, ni la forma heterocigota esperada, dado que es una F2 proveniente de un genotipo heterocigoto. Los 13 genotipos F2 provenientes de H70B mostraron valores de PF superiores al de su progenitor H70B (449.2 g) y cercanos al de M22 (2230 g).

Dentro de la progenie F2 provenientes de H77B se observaron las tres formas alélicas esperadas con los QTL14, QTL16 y QTL17. Sin embargo la comparación morfológica y

molecular se enfocó a los genotipos F2 H77-39 y H77-43 donde el valor de PF fue de 525.9 g y 1427.7 g, respectivamente, y la forma alélica obtenida para H77-39 fue homocigota segregante de M22 con los QTL14 y QTL16, mientras que con el QTL17 fue heterocigota segregante del progenitor H77B. Además, la forma alélica obtenida para H77-43 fue homocigota segregante de L7 con el QTL14, mientras que con el QTL16 y QTL17 fue heterocigota segregante del progenitor H77B. Es decir, con los QTL14 y QTL16 el genotipo H77-39 se caracterizó molecularmente como segregante de M22, pero morfológicamente fue más parecido a los progenitores L7 y H77B, mientras que con los QTL14, QTL16 y QTL17 el genotipo H77-43 se caracterizó molecularmente como segregante de L7, pero morfológicamente fue más parecido al progenitor M22. Los QTL14, QTL16 y QTL17 no son útiles para la selección molecular del carácter peso de fruto en *Carica papaya* L. var. Maradol.

El QTL7 asociado a la diámetro de fruto (DT) mostró la forma alélica heterocigota esperada en 96.4% de la progenie F1. Solo el genotipo H77B segregó la forma alélica del parental M22, sin embargo, este individuo morfológicamente mostró DF (9.37 cm) más cercano al del parental L7 (7.5 cm). En la progenie F2 proveniente tanto de H90B y como de H70B solamente se apreció la presencia alélica homocigota segregante de M22, morfológicamente la mayoría de estos genotipos F2 tuvieron DF superiores al que mostraron sus progenitores H90B y H70B. Sin embargo el genotipo F2 H90-31 presentó un DF inferior al de H90B muy cercano al de L7. La progenie F2 proveniente de H77B presentó tres formas alélicas, particularmente el genotipo F2 H77-17 molecularmente fue segregante homocigoto del parental L7, y morfológicamente presentó DF (14.1 cm) superior al de M22. Aunque pareciera que en la progenie F2 proveniente de H90B y H70B existió una correlación molecular y morfológica del DF, con el resultado obtenido en los genotipos F2 H90-31 y H77-17 se determinó que el QTL7 no podría ser confiable para la selección molecular del carácter DF en *Carica papaya* L. var. Maradol. El QTL 22 asociado a la forma de fruto en *Carica papaya* L. fue enfocado a la asociación de forma oblonga y piriforme de L7 y M22, respectivamente, dentro de la progenie F1 Y F2. En progenie F1 once individuos segregaron la forma alélica de L7 y 17 individuos segregaron la forma alélica de M22, sin guardar una relación con la forma de fruto dentro de la F1 de la misma manera se apreció dentro de la progenie F2 proveniente de H90B, H77B y H70B (Figura 3.14). Este QTL no es útil en la selección molecular del carácter forma de fruto en papaya.

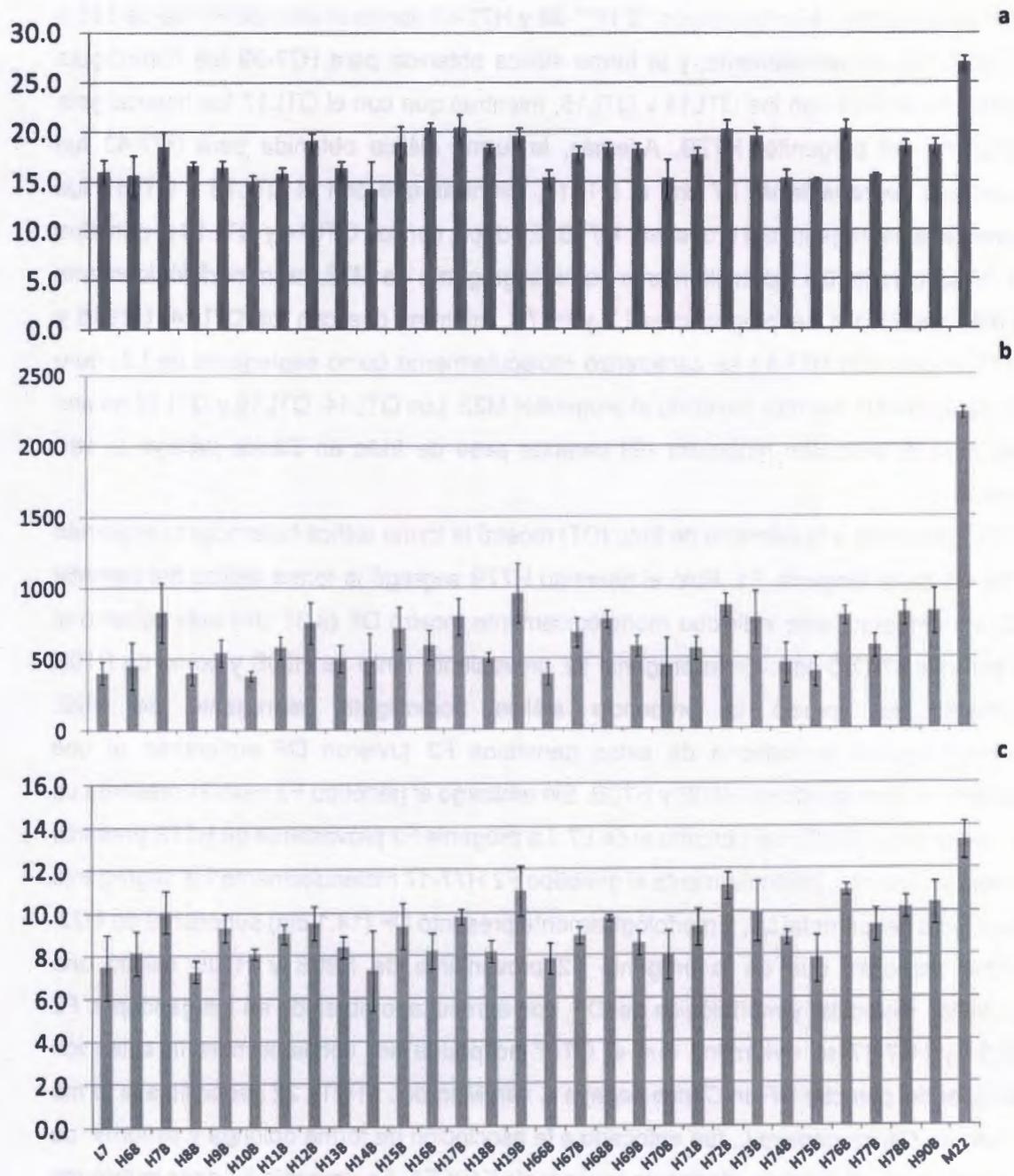


Figura 3.12. Comparación de las características morfológicas de longitud (a), peso (b) y diámetro de fruto (c) en la progenie F1 proveniente de la cruce intraespecífica Criolla Línea 7xMaradol 22 de *Carica papaya* L.

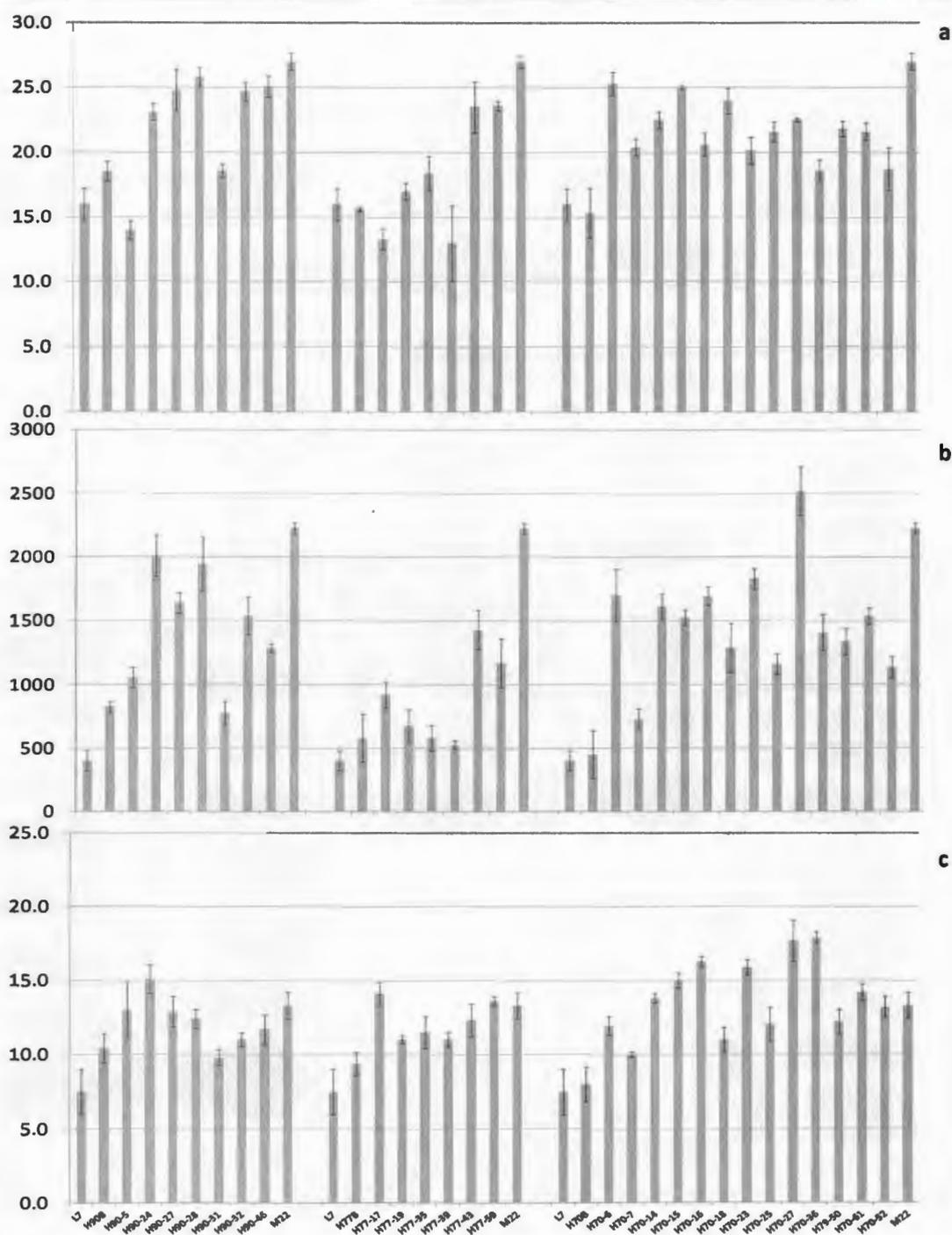


Figura 3.13. Comparación de las características morfológicas de longitud (a), peso (b) y diámetro de fruto (c) en la progenie F2 proveniente de autopolinizaciones de genotipos H90B, H77B y H70B de *Carica papaya* L.



Figura 3.14. Morfología de la forma de fruto en progenie F1 y F2 provenientes de la cruza Criolla Línea 7x Maradol 22.

III. 6. DISCUSION

III.6.1 Extracción y cuantificación de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de los materiales evaluados, utilizando el método de CTAB de (Doyle y Doyle, 1990) con varias modificaciones resultó de buena calidad y cantidad necesarias para poder realizar los análisis con marcadores moleculares de DNA 'QTLs'. La alta pureza del DNA (1.8) obtenida es un prerequisite para que los análisis moleculares tengan una alta confiabilidad y reproducibilidad (Huang *et al.*, 2013). Las concentraciones (256 a 839.2 ng. μ L⁻¹) son aceptables para que el DNA sea utilizado con éxito en las pruebas de los análisis moleculares con PCR (Solano *et al.*, 2009), y examinar la presencia de los marcadores moleculares QTLs asociados a los caracteres morfológicos de flor y fruto de papaya en parentales y progenie F1 y F2 de *Carica papaya* L.

Cuando se requiere realizar extracciones de DNA en un gran número de muestras foliares es necesario y útil contar con un protocolo estandarizado con el que sea posible descartar posibles metabolitos que contaminen la muestra y que a su vez interfiera en la amplificación de PCR. Así como también reducir el tiempo de extracción por muestra y obtener buena cantidad y calidad de DNA en cantidades masivas de muestras y puedan ser ocupados en el análisis de PCR con SSR para selección asistida por marcadores moleculares.

III.6.2 Marcador molecular CPM1815YC2: identificación de sexo de *Carica papaya* L.

La segregación en la cruce de plantas hermafroditas sigue una relación 2:1 (hermafroditas: femeninas, respectivamente) (Niroshini *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2007; Mora y Bogantes, 2004; Macedo *et al.*, 2002; Deputy *et al.*, 2002), dato que coincide con lo obtenido en este trabajo de investigación ya que de 42 plantas en la F1 el 66.66% y el 33.33% corresponde a plantas con flores hermafroditas y femeninas, respectivamente (2:1) (Figura1 y 3). Los genotipos de papaya con flores hermafroditas producen generalmente los frutos en forma alargada, con firmeza suficiente para resistir los daños mecánicos postcosecha y de mayor demanda comercial; estos ocupan menor espacio por unidad de volumen al momento del empaque, lo que representa un ahorro en el flete; principalmente para mercados de exportación (Muñozcano y Martínez, 2009; Betancourt y Nuñez, 2008).

La validación del marcador CPM1815YC2 para discriminar plantas femeninas de las hermafroditas en 42 genotipos F1 (provenientes de la cruce L7xM22) y 162 genotipos F2 derivados de la autopolinización de H70B, H77B y H90B es confiable ya que se logró a nivel molecular identificar y clasificar al 100% ambos tipos sexuales en plantas de papaya lo que muestra un gran potencial para su uso en la selección asistida por marcadores (MAS) en otros genotipos silvestres, criollos y comerciales. Además, el tipo sexual en *Carica papaya* L. solo puede ser visualizado hasta iniciada la floración (tres meses aproximadamente) (Macedo *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2012; Niroshini *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2007) de tal manera que la determinación del sexo de las plántulas de papaya a nivel molecular antes del trasplante sería una ventaja en ahorro de tiempo, espacio y dinero para el productor, siendo un complemento de la selección tradicional de plantas aptas para la producción de frutos de acuerdo con las exigencias del mercado, o para incorporarlas al programa de selección y mejora genética de la especie (Betancour y Nuñez, 2008). Además, la detección precoz o la identificación del tipo de sexo de una plántula de papaya antes de la micropropagación asegurará que las plantas micropropagadas resultantes sean 100% ya sea femeninas o hermafroditas (Magdalita y Mercado, 2003)

III.6.3 Marcador molecular CPFC: identificación de color de *Carica papaya* L.

La condición alélica obtenida con el marcador de color coincidió con los que reporta (Blas *et al.*, 2010) ya que indican que el material SunUp de color de pulpa roja amplifica una sola banda y tiene condición homocigota recesiva, mientras que los híbridos Rainbow y Richter presentan pulpa amarilla y tienen condición heterocigoto, es decir, contienen dos alelos manifestando una amplificación de doble bandas a 500 pb. También reporta que el material Kapoho presenta color de pulpa amarilla pero posee una condición homocigota dominante.

La coloración de pulpa en papaya es un aspecto que determina su aceptación por el consumidor, principalmente del mercado norte y latino-americano, cuya tendencia es la preferencia por frutos de pulpa anaranjada rojizo (Miranda *et al.*, 2002). De tal manera que el marcador de color evaluado es de gran utilidad ya que facilita la detección temprana de aquellas plantas de *Carica papaya* L. que vayan a desarrollar frutos con pulpa color naranja rojizo, para ser aprovechadas en el Programa de Mejoramiento Genético de Papaya para este carácter. La obtención de materiales de *Carica papaya* L. con pulpa naranja rojizo son caracterizados por contener un mayor contenido de licopeno que de carotenos, lo que le

imprime el color naranja rojizo a la pulpa de la papaya. Mientras que en frutos de pulpa amarilla el contenido de carotenos es mayor que el contenido de licopenos (como se evaluó en el capítulo 2 de esta tesis).

III.6.4 Marcadores moleculares QTLs asociados al fruto de *Carica papaya* L.

Los tamaños de fragmentos obtenidos *in silico* con valores entre 84 pb a 174 pb fueron los esperados y aproximados a los amplificadas por PCR en parentales L7, M22 y progenie F1 y F2, además congruentes con lo reportado por (Ferreira y Grattapaglia, 1998) quienes mencionan que los segmentos amplificadas de marcadores microsatélites (SSR) son de tamaño variante, generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases (pb). Los marcadores moleculares SSR presentan ventajas sobre otros marcadores debido a su expresión codominante, polimorfismo y segregación de manera mendeliana (Mittal y Dubey, 2009), atributos que pudieron constatarse en esta investigación.

Los ocho QTLs asociados a caracteres de morfología de fruto en parentales L7 y M22, progenie F1 y F2, no ofrecen información útil para su uso en la selección asistida por marcadores para las características cuantitativas del fruto de papaya tales como longitud, peso, diámetro y forma de fruto. Quizá esto no fue posible debido a que esos caracteres exhiben una extensa variación a lo largo de un gradiente continuo atribuidos a la interacción de dos o más genes (poligénicos) y al medio ambiente (Obando *et al.*, 2008). Con ello es de esperar que existan efectos pleiotrópicos en los QTLs asociados los caracteres de interés de papaya, los cuales guardan estrecha relación con los genes *ovate*, *sun* y *fw.2.2* presentes en el genoma de tomate y en regiones ortólogas en el genoma de papaya (Blas *et al.*, 2012; Paull *et al.*, 2008). Factores tales como la fertilización, temperatura y humedad van a influir directamente en la expresión fisiológica de cada gen por ejemplo el gen *sun* regula la elongación temprana del pericarpio del ovario, *ovate*, elongación del pericarpio del ovario después de la fertilización y *fw.2.2* regula división celular y desarrollo de fruto de tomate. Se asume que el efecto en papaya es similar, de tal manera que los QTL que estén influenciados por esos genes se verán afectados tal es el caso de algunos genotipos aquí evaluados. O bien, los marcadores de DNA 'QTLs' evaluados no están asociados a los caracteres morfológicos del fruto tales como longitud, peso, diámetro y forma del fruto de *Carica papaya* L. var. Maradol.

III.7. CONCLUSIONES

Se logró la estandarización de un protocolo para la extracción masiva de DNA genómico de *Carica papaya* L., el cual permitió la reducción de tiempo empleado y la obtención de DNA de alta concentración y pureza. Además, se estandarizaron las condiciones de PCR para cada marcador de DNA 'QTL' mediante gradientes de temperatura para garantizar la visualización del fragmento esperado.

El marcador de sexo CPM1815YC2 es útil y confiable para ser usado en la selección de una población de papaya, con el fin de identificar plantas femeninas y hermafroditas en etapa de plántulas. Por lo que se puede usar como una herramienta en la selección asistida por marcadores moleculares en *Carica papaya* L.

El marcador de color (CPFC) es útil en la selección de individuos que desarrollarán frutos con pulpa naranja rojizo en *Carica papaya* L. Sin embargo, este marcador de color (CPFC), no permite seleccionar plantas que presente frutos de tonalidades amarillas y naranjas.

Los marcadores QTLs asociados a caracteres de peso, longitud, diámetro y forma del fruto de papaya no son útiles para la selección asistida por marcadores moleculares de individuos contrastantes en esos caracteres dentro de la progenie F1 y F2 de *Carica papaya* L. provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22.

Solo nueve marcadores QTLs mostraron condición alélica contrastante en los parentales L7 y M22, sin embargo la segregación de estos en la progenie F1 y F2 de *Carica papaya* L. provenientes de la cruce interespecífica L7xM22 no se asoció a los caracteres de peso, longitud, diámetro y forma del fruto de papaya.

III.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Betancourt, S. E. y Z. V. M. Nuñez (2008). Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). Revista Corpoica—Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 9(2), 31-36.
- Blas, A. L. (2008). Molecular genetic basis of papaya fruit traits. Thesis in doctor of philosophy in molecular biosciences and bioengineering. University of Hawaii. 185 p.
- Blas, A. L., Q. Yu, O. J. Veatch, E. Robert, H. M. Paull y R. Ming. (2012). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. Molecular Breeding, 29(2), 457-466.
- Blas, A., R. Ming, Z. Liu, Veatch O.J., E. Robert, H. Paull y Q. Yu. (2010). Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene β -Cyclase, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination Hot Spot. Plant Physiology, 152, 2013-2022.
- Chen, C., Q. Yu, S. Hou, Y. Li, M. Eustice, R. L. Skelton, O. Veatch, R. E. Herdes, L. Diebold, J. Saw, Y. Feng, W. Qian, L. Bynum, L. Wang, P. Moore, R. E. Paull, M. Alam y R. Ming (2007). Construction of a sequence tagged high density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in brassicales. Genetics, 177, 2481-2491.
- Demey, J. R., Y. A. Zambrano, F. Fuenmayor y V. Segovia (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica de una colección de yuca. Interciencia, 18, 684-689.
- Deputy, J. C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt y J. I. Stiles (2002). Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). Theoretical Applied Genetics, 106(1), 107-111.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus, 12, 13-15.
- Esquivel, M. A., A. M. Bautista, G. M. Ortiz, A. Quiroz, W. Rohde y T. L. F. Sánchez (2009). Caracterización de accesiones de papaya (*Carica papaya* L.) a través de marcadores AFLP en Cuba. Revista Colombiana de Biotecnología, 2, 31-39.
- Ferreira, M.E. y D. Grattapaglia (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ª ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. 220 p.

- Franco, T. L. y R. Hidalgo (2003). Análisis estadísticos de datos de la caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico No. 8. IPGRI. Cali, Colombia. 89 p.
- Huang, Q. X., X. Ch. Wang, H. Kong, Y. L. Guo y A. P. Guo (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 12(19), 2727-2732.
- Kim, M. S., P. H. Moore, F. Zee, M. M. M. Fitch, D. L. Steiger y R. M. Manshardt (2002). Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, 45, 503-512.
- Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman y B. A. Schaal (1993). Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theoretical Applied Genetics*, 85, 1-7.
- Ma, H., P. H. Moore, Z. Liu, M. S. Kim, Q. Yu, M. M. M. Fitch, T. Sekioka, A. H. Paterson y R. Ming (2004). High density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. *Genetics*, 166, 419-436.
- Macedo, L. E. G., S. C. L. S. Petrarolha y H. Z. Actis (2002). Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica*, 127, 179-184.
- Madarbokus, S. y V. M. Ranghoo-Sanmukhiya (2012). Identification of genetic diversity among Papaya varieties in mauritius using Morphological and molecular markers. *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*, 1(4), 152-164.
- Magdalita, P.M. y Ch. P. Mercado (2003). Determining the Sex of Papaya for Improved Production. Food and Fertilizer Technology Center. University of the Philippines at Los Banos College, Laguna, Philippines. FFTC publication database, extension bulletins 534, 6 p.
- Martin, M. (2010). Conservación de Recursos Fitogenéticos. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA): http://www.esporus.org/recursos/articles/agrobiodiversitat/conservacion_rec_fitog_i_saura_martin.pdf, (acceso 25 de Octubre 2013).
- Martínez, L., P. Cavagnaro y R. Masuelli (2006). Caracterización molecular de variedades de vid (*Vitis vinifera*) de calidad enológica por marcadores microsatélites. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 38(1), 77-86.
- Ming, R., Q. Yu y P. H. Moore 2007. Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18, 401-408.

- Miranda, S. P., G. Fagundes, J. A. Filho, A. De Moraes, L. De Lima y O. Yamanishi (2002). Características físicas e químicas de mamões dos grupos 'Solo' e 'Formosa' cultivados em Brasília-DF. In: XVII Congreso Brasileiro de Fruticultura, 18-22 nov, 2002, Belen-Pará-Brasil.
- Mittal, N. y A.K. Dubey (2009). Microsatellite markers- A new practice of DNA based markers in molecular genetics. *Pharmacognosy Reviews*, 3(6), 235-246.
- Mondragón, J. C. (2001). Cactus pear breeding and domestication. *Plant Breeding Reviews*, 20, 135-166.
- Mora, E. y A. Bogantes (2004). Evaluación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) en Pococí, Limón, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 15, 39-49.
- Muñozcano, R. M. y A. C. O. Martínez (2009). Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa A.C. 37 p.
- Niroshini, E. J., M. D. T. Everard, E.H. Karunanayake y T. L. S. Tirimanne (2008). Detection of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to sex expression in *Carica papaya* L. *Journal of the National Science Foundation Sri Lanka*, 36(2), 145-150.
- Obando, J., T. J. P. Fernández, J. A. Martínez, A. L. Alarcón, I. Eduardo, P. Arús y A. J. Monforte (2008). Identification of melon fruit quality quantitative trait loci using near-isogenic lines. *Journal of the America Society for Horticultural Science*, 133, 139-151.
- Oliveira, E. J., C. J. Leles, D. S. Ferraz, F. C. Moraes, S. A. Santos D. J. L. Loyola (2011). Molecular characterization of papaya genotypes using AFLP markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 848-858.
- Paran, I. y R. W. Michelmore (1993). Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics*, 85, 985-993.
- Paull, R. E., B. Irikura, P. Wu, H. Turano, N. J. Chen, A. Blas, J. K. Fellman, A. R. Gschwend, C. M. Wai, Q. Yu, G. Presting, M. Alam y R. Ming (2008). Fruit development, ripening and quality related genes in the papaya genome. *Tropical Plant Biology*, 1, 246-277.
- Rajeswari, K. S. (2004). Construction of an AFLP linkage map and analysis of QTLs for economic traits in papaya (*Carica papaya* L.). Thesis in doctor of philosophy in Horticulture. University of Hawaii. 174 p.

- Reddy, S. R., K. R. Balamurali y R. K. Jagadeeswara (2012). Sex determination of Papaya (*Carica papaya* L.) at seedling stage through RAPD markers. *Research in Biotechnology*, 3(1), 21-28.
- Santiago, S. P. y P. J. H. Ramírez (2012). prfectBLAST: a platform-independent portable front end for the command terminal BLAST+ stand-alone suite. *BioTechniques*, 53, 299-300.
- Solano, F. G., C. M. P. Márquez y I. Schuler (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 16-22.
- Sudha, R., D. R. Singh, M. Sankaran, V. Damodaran y P. Simachalam (2013). Genetic diversity analysis of papaya (*Carica papaya* L.) genotypes in Andaman Islands using morphological and molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, 8(41), 5187-5192.
- Suresh, N. S. (1994). Construction of a genetic linkage map of papaya and mapping traits of horticultural importance. Thesis in doctor of philosophy in Horticulture. University of Hawaii. 196 p.
- Valadéz, M. E. y G. Kahl (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas: teorías y protocolos. Universidad Autónoma Chapingo. Mundi Prensa. México, D.F. 164 p.
- Valdés, I. J. y N. N. Rodríguez (2003). Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales tropicales. FAO, <http://fao.cubasi.cu>, 25 p.
- Vegas, G. A., A. Miliani, D. Rodríguez, A. Zambrano, V.J. L. Vicente y J. R. Demey (2013). Diversidad genética de la colección Venezolana de la familia Caricáceas. *Interciencia*, 38, 171-178.

CAPITULO IV

EVALUACIÓN AGRO-MORFOLÓGICA Y OBTENCIÓN DE LA HUELLA GENÉTICA MEDIANTE AFLP EN *Carica papaya* L. var. MARADOL EN PARENTALES LÍNEA 7 (CRIOLLA), MARADOL 22 (COMERCIAL) Y SU PROGENIE F1.

IV.1. INTRODUCCIÓN

La comparación tanto de poblaciones silvestres como poblaciones comerciales (Maradol, principalmente) muestran un gran contraste y una amplia variación para muchos caracteres agro-morfológicos (Ocampo, 2006), especialmente en relación a caracteres foliares, tipo de flores, tamaño y forma de fruto, tolerancia a plagas y enfermedades, entre otras.

En general, *Carica papaya* L. resulta una especie interesante como modelo de estudio en análisis de genómica y diversidad genética debido a su rápido desarrollo, su amplio rango de variabilidad de germoplasma y su vasta producción de semillas (Liu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2008). Aunque existen reportes de colectas, conservación y documentación de diferentes accesiones de papaya (Colunga y Zizumbo, 2004) los estudios relacionados a diversidad genética de esta especie en México son muy limitados.

La determinación de la diversidad genética fenotípica y molecular en papaya podría ser de utilidad para conocer la habilidad de adaptación de esas poblaciones a su ambiente natural a través de la selección natural que ha sufrido, además para el desarrollo del proceso de obtención de nuevos y mejores cultivares enfocado a la detección de algún grado de asociación entre cierto marcador molecular con algún carácter agronómico de interés (Moore, 2014). Los marcadores moleculares son una herramienta útil y han sido usados en el análisis de diversidad genética, así como para facilitar el mejoramiento genético de muchos cultivos entre ellos *Carica papaya* L. (Eustice *et al.*, 2008). Diferentes técnicas moleculares han sido aplicadas para el análisis de diversidad genética en papaya, dentro de las que destacan aquellas con marcadores de isoenzimas, RAPDs, AFLPs, ISSR y SSRs (Kim *et al.*, 2002; Esquivel *et al.*, 2009; Olivera *et al.*, 2011; Madarbokus y Ranghoo-Sanmukhiya, 2012; Vegas *et al.*, 2013; Sudha *et al.*, 2013).

En particular, los marcadores AFLP suelen ser preferibles respecto a otros marcadores moleculares, debido a que estos no requieren de previa información genética, además el proceso de la técnica tiene mayor rapidez, produce un gran número de marcadores y es altamente reproducible (Vos *et al.* 1995; Jones *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2007). Estos marcadores son indicados para estudios de variabilidad, se utilizan ampliamente en la evaluación de diversidad genética, análisis de distancia genética, huella identificadora de ADN, análisis de colecciones de germoplasma, construcción de mapas genéticos o saturación de zonas determinadas del genoma, en la búsqueda de marcadores estrechamente ligados a genes de interés económico "QTLs" o su clonaje posicional (Mueller y Wolfenbarguer, 1999). Teniendo en cuenta la versatilidad de estos marcadores AFLPs, en este experimento se caracterizaron genotipos de *Carica papaya* L. para evaluar su diversidad genética mediante marcadores morfológicos y marcadores moleculares AFLPs.

IV. 2. HIPÓTESIS

La huella genética generada con AFLPs en parentales Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial), y su progenie F1 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 en *Carica papaya* L. es útil para detectar polimorfismos entre los progenitores y la segregación del mismo en su progenie F1, además la agrupación de los materiales basados en AFLPs debe estar correlacionada con la agrupación obtenida a partir de caracteres agromorfológicos.

IV.3. OBJETIVOS

IV.3.1. Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética de *Carica papaya* L. en parentales Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial), y su progenie F1 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 mediante marcadores morfológicos y moleculares tipo AFLP.

IV.3.2. Objetivos específicos

Caracterizar morfológicamente el material vegetal parental receptor Línea 7 (Criolla) y el parental donador de polen Maradol 22 (Comercial), así como su progenie F1 proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L.

Caracterizar molecularmente y obtener la huella genética mediante AFLP en parentales Línea (Criolla) 7 y Maradol 22 (Comercial), así como su progenie F1 proveniente de la cruce intraespecífica L7xM22 en *Carica papaya* L.

Identificar bandas polimórficas en parentales Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial) en su progenie F1 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 en *Carica papaya* L.

Estimar el índice de similitud genética morfológica y molecular en parentales Línea 7 (Criolla), Maradol 22 (Comercial), y progenie F1 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 en *Carica papaya* L.

IV.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares y el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, ambos de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

IV.4.1 Material vegetal

Se utilizaron los parentales Línea 7 (Criolla) y Maradol 22 (Comercial) (Material proporcionado por el Ing. Fernando Contreras), así como también su progenie F1 de la cruce intraespecífica Línea 7 por Maradol 22 (L7xM22) que constó de 28 plantas hermafroditas, 14 plantas femeninas y una planta masculina obtenidas del Banco de Germoplasma de Papaya del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

IV.4.2 Variables morfológicas evaluadas

Para obtener un análisis agromorfológico más completo de los genotipos utilizados las 32 variables evaluadas se reportan en el Cuadro 4.1 (Anexo II).

IV.4.3 Extracción de DNA

El DNA de las muestras analizadas en el capítulo II fue utilizado para el desarrollo de esta técnica molecular. Se procedió a realizar una dilución hasta obtener una concentración final de DNA de $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

IV.4.4 Digestión de DNA

Una vez alicuotado el DNA a una concentración de $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ se realizó la digestión del ADN con la combinación de dos enzimas, una de corte raro (EcoR1) y otra de corte frecuente (Mse I). La enzima EcoR1 reconoce 6 pb, mientras que la enzima Mse I tiene lugar de reconocimiento cada 4 pb. La utilización de ambas enzimas genera más fragmentos de ADN que con solo una de ellas. La mezcla de reacción de la digestión se aprecia en la el Cuadro 4.2 (Anexo III).

La reacción se incubó durante tres horas a 37°C en un termociclador, posteriormente las muestras se incubaron a 65°C por 15 minutos con el propósito de inactivar las enzimas de restricción. Inmediatamente, las muestras se almacenaron a -20°C.

IV.4.5 Ligación de adaptadores

A la digestión anterior se le adicionaron los componentes mencionados en el Cuadro 4.3 (Anexo IV) para llevar a cabo la ligación de adaptadores complementarios a los cortes de cada una de las enzimas de restricción.

La reacción se incubó a 18°C durante 16 horas. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio a 80 Volts durante 15 minutos, en el que se cargó 15 µL de muestra y 2 µL de buffer de carga. Con una visualización con intensidad homogénea de la digestión/ligación con lo que se procedió a realizar la dilución de todas las muestra en una proporción 1:5.

IV.4.6 Preamplificación o amplificación preselectiva

Para preparar las reacciones de preamplificación se utilizaron los componentes mencionados en el Cuadro 4.4 (Anexo V).

Las muestras se sometieron al perfil de temperaturas en el termociclado mostrado en el Cuadro 4.5 (Anexo VI)

Las muestras fueron sometidas a una electroforésis en agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio a 80 Volts durante 15 minutos, en el que se cargó 7 µL de producto PCR más 2 µL de buffer de carga.

Se hicieron diluciones de las muestras PCR en proporción 1:10 y 1:5 de acuerdo a la visualización de concentración de las muestras en el gel de agarosa (de acuerdo a la intensidad de la banda). Se alicuotaron en placas de PCR 5 µL de cada dilución por pozo en tres bloques que posteriormente se usó en la amplificación selectiva.

IV.4.7 Amplificación selectiva

Para realizar la amplificación selectiva fueron necesarios los componentes reportados en el Cuadro 4.6 (Anexo VII) y un programa de perfil de temperatura como se indica en el Cuadro 4.7 (Anexo VIII).

IV.4.8 Detección automatizada de AFLP

Dilución de la Amplificación selectiva: Se colocó 4 μL de SLS (formamida) en un bloque de 45 pozos, y 3 μL de SLS (formamida) en dos bloques más de 45 pozos, posteriormente se adicionaron 2 μL de producto de PCR derivado de la-amplificación selectiva a cada pozo en dirección de columna según correspondiera el número de muestra.

Secuenciación automática de muestras: Se preparó la mezcla de reacción con marcador de peso como se aprecia en el Cuadro 4.8 (Anexo IX), la cual se mantuvo durante un minuto continuo en el vortex.

Se tomaron 25 μL de la mezcla anterior y se colocó en una placa de PCR en un bloque de 45 pozos, a los cuales se le agregaron 2 μL de producto PCR en cada pozo correspondiente a los tres bloques de muestras obtenidas de la amplificación selectiva. A la mezcla obtenida anteriormente se adicionó una gota de aceite mineral, evitando que se formen burbujas.

También se preparó una placa de ELISA a la cual se le colocaron 10 gotas de buffer de separación, en la que se limpiaron los capilares después de haber leído las ocho muestras correspondientes.

Una vez terminada la preparación de ambas placas se colocaron en el secuenciador automático donde la detección de AFLPs se llevó a cabo por electroforesis capilar el cual posee una serie de ocho capilares de separación.

Los fragmentos detectados se muestran como perfil de picos o electroferogramas y se arrojan datos de tamaño de bandas por cada pico detectado.

IV.5. RESULTADOS

IV.5.1 Análisis agro-morfológico

El dendograma obtenido con los marcadores morfológicos separó a los parentales L7 y M22, los cuales formaron dos grupos con genotipos F1 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 (Figura 4.1).

Los genotipos F1 que se agruparon con el parental L7 compartieron en promedio el 55.0% de similitud, donde el genotipo F1 H66B tuvo mayor similitud genética (0.688) con L7, mientras que los genotipos que se agruparon con el parental M22 compartieron en promedio el 63.3% de similitud, y fue el genotipo F1 H90B que presentó mayor similitud genética (0.840) con M22 (Cuadro 4.9). En relación a la menor correlación de similitud genética (0.281) los genotipos F1 H15B, H70B y H90B presentaron la mayor distancia genética con L7. Con una baja correlación genética de similitud (0.130) el genotipo F1 H71B presentó la mayor distancia genética con M22.

La comparación de similitud genética respecto a los caracteres morfológicos evaluados solo entre genotipos F1 arrojó un 51.9% de similitud, donde los genotipos H13B y H14B mostraron el más alto grado de similitud (0.906) lo que indicó que estos son genotipos comparten gran parte de sus características fenotípicas. Por el contrario los genotipos que presentaron la menor correlación de similitud (0.125) en cuanto a caracteres fenotípicos son H66B y H12B. Los datos de correlación de similitud genética se reflejaron en la ubicación de los genotipos F1, es decir genotipos con correlación de similitud alta se ubicaron dentro del mismo grupo de conglomeración y aquellos con menor correlación de similitud se ubicaron en grupos separados.

Cuadro 4.9. Similitud genética de parentales y progenie F1 proveniente de la cruce interespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L. basada en el coeficiente Simple Matching y obtenida con 32 caracteres morfológicos.

	L7	M22	H6B	H7B	H8B	H9B	H10B	H11B	H12B	H13B	H14B	H15B	H16B	H17B	H18B	H19B	H66B	H67B	H68B	H69B	H70B	H71B	H72B	H73B	H74B	H75B	H76B	H77B	H78B	H90B	
L7	1.000																														
M22	0.380	1.000																													
H6B	0.469	0.660	1.000																												
H7B	0.281	0.590	0.563	1.000																											
H8B	0.563	0.480	0.594	0.531	1.000																										
H9B	0.500	0.380	0.594	0.656	0.688	1.000																									
H10B	0.563	0.480	0.656	0.656	0.688	0.625	1.000																								
H11B	0.481	0.470	0.688	0.625	0.469	0.656	0.594	1.000																							
H12B	0.375	0.750	0.656	0.594	0.500	0.375	0.438	0.406	1.000																						
H13B	0.500	0.190	0.469	0.469	0.688	0.688	0.625	0.719	0.250	1.000																					
H14B	0.488	0.160	0.438	0.438	0.719	0.719	0.594	0.625	0.281	0.906	1.000																				
H15B	0.281	0.780	0.688	0.625	0.469	0.469	0.469	0.500	0.844	0.281	0.375	1.000																			
H16B	0.688	0.310	0.406	0.469	0.563	0.563	0.500	0.406	0.438	0.563	0.656	0.406	1.000																		
H17B	0.344	0.780	0.750	0.563	0.406	0.406	0.406	0.406	0.563	0.844	0.281	0.250	0.813	0.406	1.000																
H18B	0.406	0.660	0.688	0.500	0.469	0.344	0.531	0.500	0.844	0.281	0.375	0.813	0.531	0.750	1.000																
H19B	0.469	0.280	0.313	0.625	0.531	0.594	0.531	0.438	0.344	0.656	0.625	0.313	0.531	0.313	0.313	1.000															
H66B	0.688	0.410	0.344	0.344	0.500	0.563	0.500	0.531	0.125	0.750	0.719	0.219	0.688	0.219	0.281	0.656	1.000														
H67B	0.375	0.690	0.656	0.656	0.625	0.375	0.625	0.469	0.750	0.313	0.406	0.844	0.500	0.719	0.781	0.406	0.250	1.000													
H68B	0.344	0.540	0.313	0.750	0.531	0.531	0.656	0.500	0.469	0.594	0.563	0.375	0.469	0.438	0.375	0.750	0.469	0.469	1.000												
H69B	0.486	0.520	0.500	0.500	0.719	0.469	0.781	0.438	0.531	0.594	0.563	0.438	0.594	0.500	0.563	0.500	0.469	0.594	0.688	1.000											
H70B	0.281	0.660	0.750	0.625	0.594	0.469	0.656	0.625	0.719	0.406	0.438	0.750	0.344	0.625	0.750	0.375	0.219	0.781	0.438	0.563	1.000										
H71B	0.625	0.130	0.406	0.469	0.625	0.688	0.563	0.531	0.313	0.750	0.719	0.156	0.625	0.344	0.281	0.781	0.688	0.250	0.719	0.594	0.281	1.000									
H72B	0.500	0.250	0.281	0.594	0.438	0.625	0.500	0.531	0.313	0.750	0.656	0.344	0.563	0.406	0.281	0.781	0.688	0.313	0.781	0.531	0.219	0.750	1.000								
H73B	0.473	0.560	0.531	0.719	0.500	0.500	0.688	0.406	0.750	0.375	0.406	0.719	0.500	0.656	0.719	0.469	0.313	0.688	0.656	0.656	0.531	0.438	0.563	1.000							
H74B	0.594	0.160	0.313	0.375	0.469	0.594	0.469	0.563	0.156	0.781	0.750	0.188	0.594	0.188	0.250	0.625	0.844	0.156	0.563	0.500	0.313	0.719	0.719	0.344	1.000						
H75B	0.563	0.310	0.469	0.531	0.438	0.625	0.625	0.719	0.188	0.750	0.656	0.281	0.500	0.281	0.281	0.531	0.813	0.250	0.594	0.469	0.344	0.625	0.688	0.438	0.844	1.000					
H76B	0.500	0.310	0.219	0.594	0.438	0.563	0.438	0.406	0.438	0.625	0.594	0.281	0.625	0.344	0.344	0.781	0.625	0.250	0.781	0.531	0.281	0.750	0.813	0.563	0.719	0.625	1.000				
H77B	0.469	0.530	0.688	0.375	0.406	0.344	0.406	0.500	0.719	0.344	0.375	0.625	0.469	0.688	0.688	0.313	0.344	0.531	0.375	0.438	0.688	0.469	0.281	0.469	0.438	0.406	0.406	1.000			
H78B	0.563	0.310	0.219	0.469	0.375	0.500	0.313	0.344	0.313	0.625	0.594	0.281	0.625	0.344	0.219	0.781	0.750	0.250	0.656	0.406	0.219	0.688	0.813	0.375	0.781	0.625	0.813	0.406	1.000		
H90B	0.281	0.840	0.625	0.688	0.406	0.406	0.531	0.563	0.719	0.281	0.250	0.750	0.344	0.750	0.625	0.313	0.156	0.719	0.500	0.500	0.750	0.219	0.344	0.594	0.188	0.344	0.406	0.625	0.281	1.000	
Máx.	0.688	0.840	0.750	0.750	0.719	0.719	0.781	0.719	0.844	0.906	0.750	0.844	0.688	0.750	0.781	0.781	0.844	0.781	0.781	0.656	0.750	0.750	0.813	0.594	0.844	0.625	0.813	0.625	0.281	Prom.	
Mín.	0.281	0.130	0.219	0.344	0.375	0.344	0.313	0.344	0.125	0.281	0.250	0.156	0.344	0.188	0.219	0.313	0.156	0.156	0.375	0.406	0.219	0.219	0.281	0.344	0.188	0.344	0.406	0.406	0.281	gral.	
Prom.	0.466	0.471	0.512	0.555	0.530	0.529	0.541	0.513	0.493	0.545	0.525	0.477	0.524	0.473	0.450	0.576	0.510	0.438	0.614	0.519	0.403	0.582	0.603	0.464	0.594	0.500	0.542	0.516	0.281	0.512	

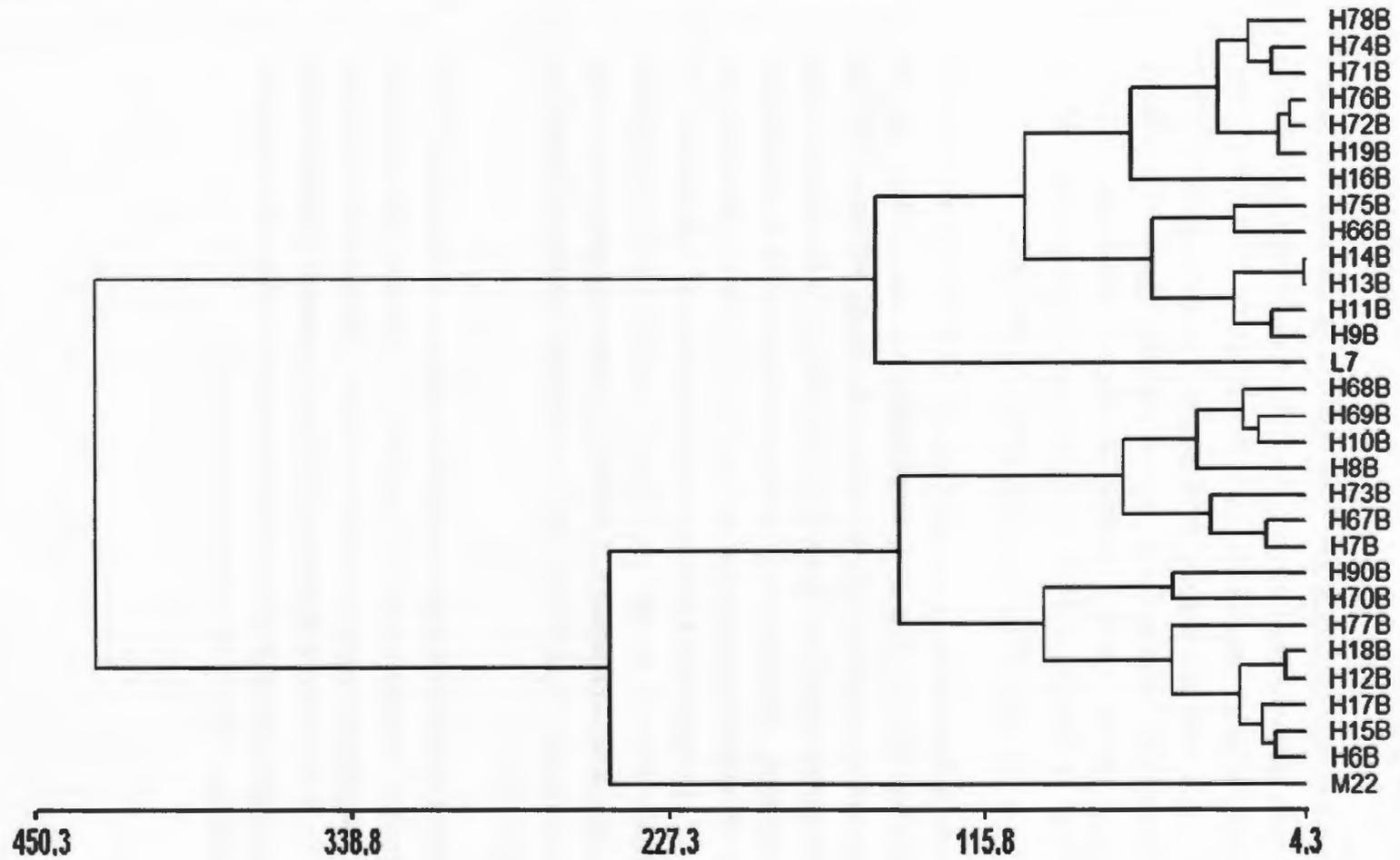


Figura 4.1. Dendrograma de parentales L7, M22 y progenie F1 de papaya obtenido de 32 caracteres morfológicos basado en el método Ward y distancias euclideas al cuadrado.

IV.5.2 Análisis molecular con AFLP

Las cuatro combinaciones de marcadores AFLP aplicados en 28 genotipos de papaya provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 a través de electroferogramas mostraron un rango desde 22 hasta 74 fragmentos para E-ACA/M-CTA y E-ACT/M-CGA, respectivamente, y un total de fragmentos con todas las combinaciones probadas de 217, con un valor promedio de 54.25 fragmentos de DNA visualizados (Cuadro 4.10 y Figura 4.3). Los tamaños de fragmentos fueron en un rango de 89 pb a 234 pb para E-ACA/M-CTA, en un rango de 61 pb a 290 pb para E-ACT/M-CGA, en un rango de 62 pb a 277 pb para E-ACC/M-CTA y en un rango de 61 pb a 229 pb para E-ACT/M-CTT.

Dentro de los fragmentos monomórficos el rango fue desde 6 hasta 36 fragmentos para E-ACA/M-CTA y E-ACT/M-CGA/E-ACT/M-CTT, respectivamente, con un total de 104 fragmentos con esta similitud genética. Los fragmentos polimórficos mostraron un rango desde 16 hasta 42 fragmentos para E-ACA/M-CTA y E-ACC/M-CTA, respectivamente, con un total de 113 fragmentos polimórficos lo que representó un 54.48% de polimorfismo obtenido con todas las combinaciones evaluadas dentro de la población de papaya. Las combinaciones con mejor porcentaje de bandas polimórficas fueron E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CTA, E-ACT/M-CGA, con un valor de 72.73%, 61.74% y 51.35% de fragmentos polimórficos, mientras que la combinación E-ACT/M-CTT a pesar que generó uno de los valores más altos de bandas o fragmentos totales solo presentó 32.08% de fragmentos polimórficos (Cuadro 4.10).

La variabilidad genética entre los 45 genotipos de *Carica papaya* L. evaluados se estimó mediante la comparación por pares de similitud genética. En la Figura 4.2 se observa que el promedio de similitud genética por pares (pairwise) fue de 0.639 y mostró un rango de 0.35 a 0.84. El 81.6% de los datos de comparación por pares mostraron que dentro de los 45 genotipos de papaya evaluados existe una similitud genética mayor a 0.60; y menos del 18.4% de esos datos mostró una similitud genética menor a 0.52

Cuadro 4.10. Combinaciones de iniciadores usados en la obtención de huella genética y distribución de fragmentos totales, monomórficos y polimórficos en parentales y progenie F1 proveniente de L7xM22 de *Carica papaya* L.

Combinación de AFLP	No. total de bandas	No. de bandas monomórficas	No. de bandas polimórficas	Bandas polimórficas (%)
E-ACA/M-CTA	22	6	16	72.73
E-ACT/M-CGA	74	36	38	51.35
E-ACC/M-CTA	68	26	42	61.74
E-ACT/M-CTT	53	36	17	32.08
Total	217	104	113	54.48%

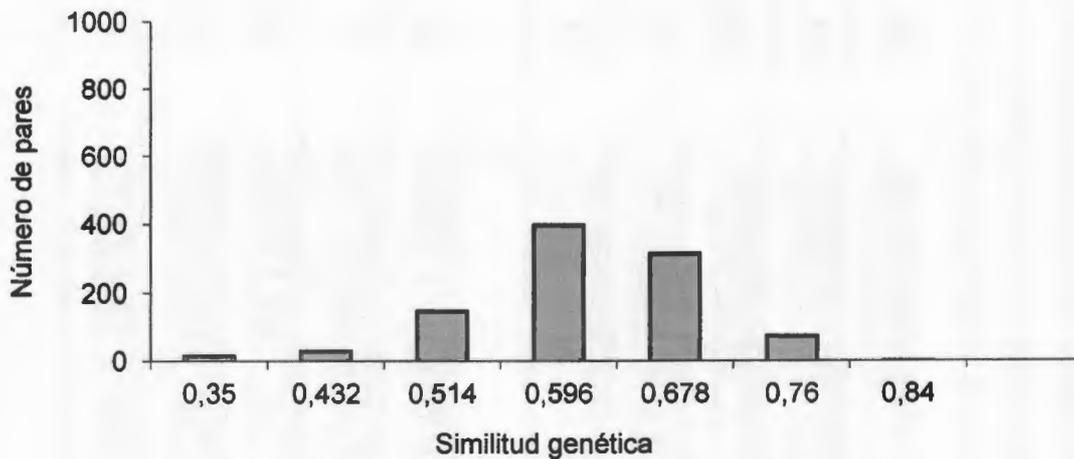


Figura 4.2. Distribución de datos obtenidos mediante comparación por pares de la similitud genética entre 45 genotipos de *Carica papaya* L.

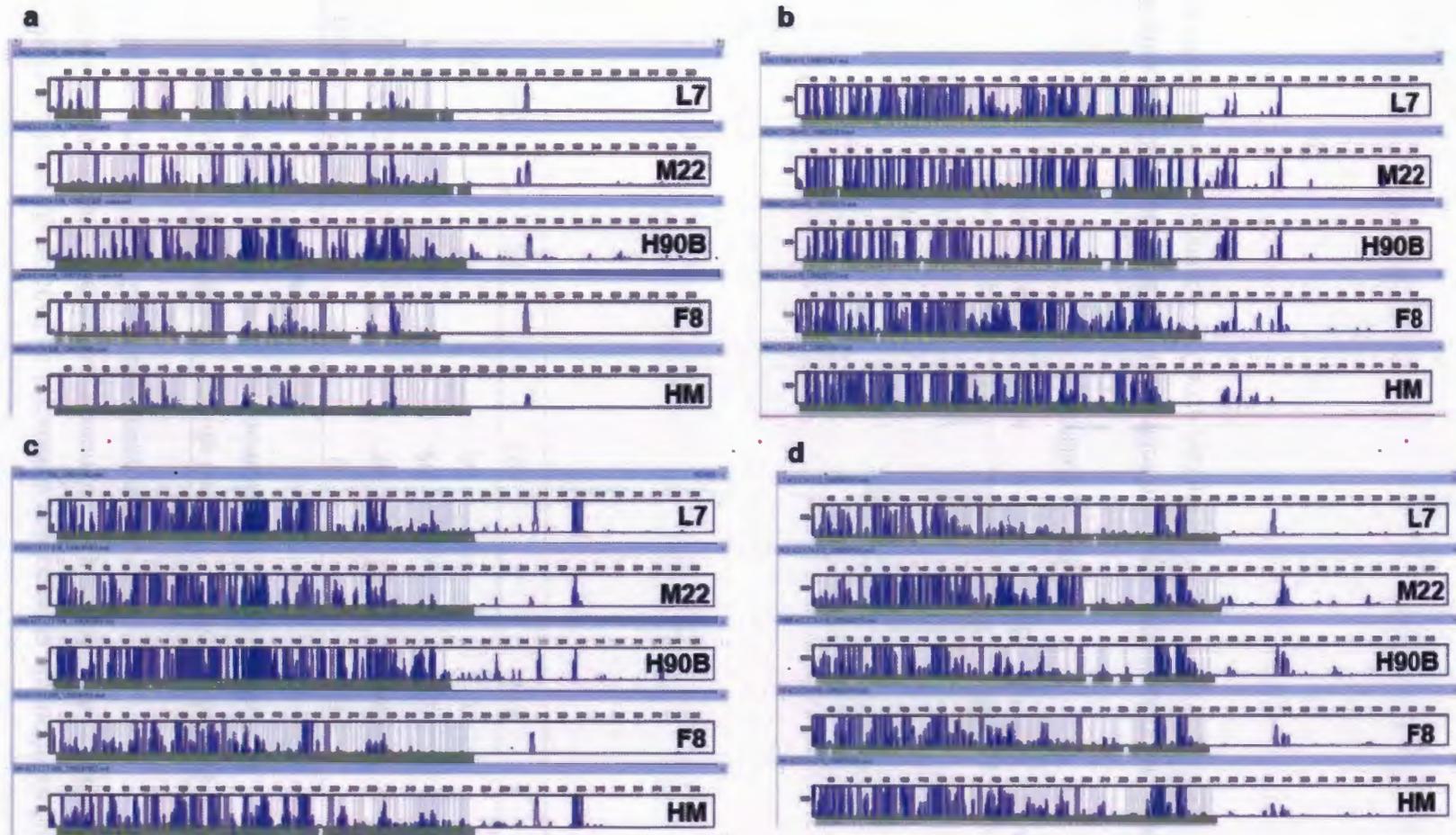


Figura 4.3. Electroferogramas obtenidos con las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP (E-ACA/M-CTA (a), E-ACT/M-CGA (b), E-ACT/M-CTT (c), E-ACC/M-CTA (d) en parentales Línea 7 (Criolla) (L7), Maradol 22 (Comercial) (M22) y genotipos F1 representado por una planta hermafrodita (H90B), una planta femenina (F8) y una planta masculina (HM), todas provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22.

Los valores de correlación cofenética obtenidos mediante el análisis de conglomerados UPGMA y la matriz de similitud DICE mostró una correlación de 0.652. En el Cuadro 4.11 se muestra que la similitud genética molecular entre todos los genotipos de *Carica papaya* L. evaluados tuvo un rango de correlación desde 0.35 a 0.84. En general, el genotipo H9B con una correlación promedio de 0.44 es el que menos similitud genética muestras respecto al resto de los genotipos evaluados. Mientras que los genotipos, H72B y F95 con una correlación de 0.84 son individuos que presentaron una estrecha similitud genética molecular. Los datos de similitud genética molecular entre los genotipos hermafroditas mostraron una correlación de 0.664, con un valor mínimo de 0.350 y máxima de 0.830 (H9B vs H72B y H10B vs H67B/H70B vs H78B, respectivamente). El valor de correlación entre los genotipos femeninos fue de 0.650, con un valor mínimo de 0.50 y máxima de 0.79 (F10 vs F6, F95 vs F96, respectivamente). La correlación entre femeninas y hermafroditas fue de 0.644, con un valor mínimo de 0.45 y máxima de 0.84 (F10 vs H6B y F95 vs H71B, respectivamente). Una correlación de 0.630 mostró el genotipo masculino HM con un valor mínimo de 0.47 y máxima de 0.73 (HM vs H9B, HM vs F96, respectivamente). La correlación presente entre los parentales L7 y M22 respecto a los genotipos F1 mostró una similitud muy semejante. De tal manera que la correlación entre L7 y los genotipos hermafroditas F1 fue de 0.651, con un valor mínimo de 0.51 y máxima de 0.71 (L7 vs H6B, L7 vs F9, respectivamente). Mientras que la correlación entre M22 y los genotipos F1 fue de 0.662, con un valor mínimo de 0.51 y máxima de 0.77 (M22 vs H9B, M22 vs H78B, respectivamente). El dendograma generado mostró dos grupos, quedando por un lado el genotipo H9B y en otro los 44 genotipos restantes (Figura 4.4). El coeficiente de similitud genética obtenido en la población de papaya analizada se vio reflejado sobre la distribución de agrupamiento de los genotipos evaluados, es decir, en general existe una estrecha relación genética de estos individuos. Sin embargo dentro del segundo grupo se pudo apreciar que el genotipo masculino HM se separó del 82.14% y el 57.14% de genotipos F1 tipo hermafroditas y femeninos, respectivamente. Estos últimos formaron otros dos subgrupos, en el primero se encontró al parental L7 y los genotipos F9, F99, H66B, H68B y H76B los cuales comparten un índice de similitud genética molecular del 65.1% y en el segundo al parental M22 agrupado con 20 genotipos hermafroditas y seis genotipos femeninos H76B los cuales comparten un índice de similitud genética molecular del 66.2%; es decir, los marcadores AFLP presentes en M22 segregaron en la mayor parte de la población F1.

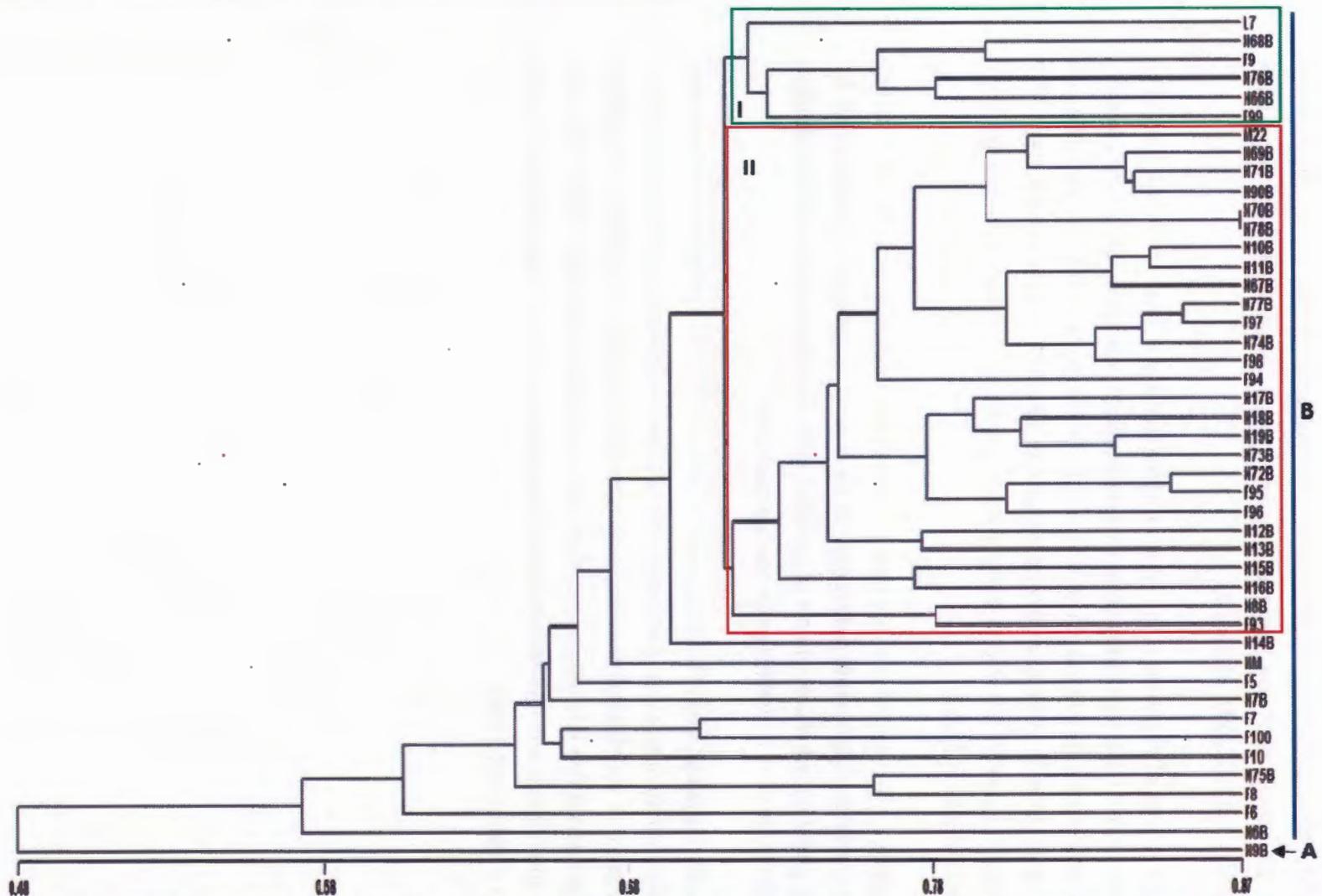


Figura 4.4. Dendrograma generado por el método UPGMA, usando el coeficiente de similitud de DICE, a partir de los patrones de fragmentos generados por cuatro pares de iniciadores de AFLPs en 45 genotipos de *Carica papaya* L.

Los primeros tres componentes principales contemplaron el 22.1% de la variación observada, pero solo fueron considerados los primeros dos componentes para visualizar el agrupamiento de la población evaluada.

En la Figura 4.5 se observan que los grupos formados con el análisis de componentes principales reforzaron los resultados obtenidos mediante el análisis de conglomerados. Se distinguen dos grupos quedando en el primero el 97.7% de la población evaluada, sin embargo dentro del mismo se apreció un subgrupo de genotipos F1 con marcadores AFLP segregantes del parental L7 y otro subgrupo de genotipos F1 con marcadores AFLP segregantes del parental M22.

Además, existen otros genotipos que aunque comparten similitud genética con ambos subgrupos quedaron ligeramente separados, tal es el caso de genotipo masculino HM. En el segundo grupo se ubicó únicamente al genotipo H9B el cual presentó la menor similitud genética con el resto de la población de papaya evaluada.

La distribución de subgrupos identificados por el método UPGMA, en general, se mantuvo con el análisis de componentes principales, con ambos se confirma que los parentales L7 y M22 poseen una variabilidad genética relativamente estrecha, sin embargo, se pueden identificar genotipos con información genética distantes como el genotipo H9B y F6 o bien genotipos que presentaron una caracterización molecular con AFLP segregante ya sea del parental L7 o del parental M22.

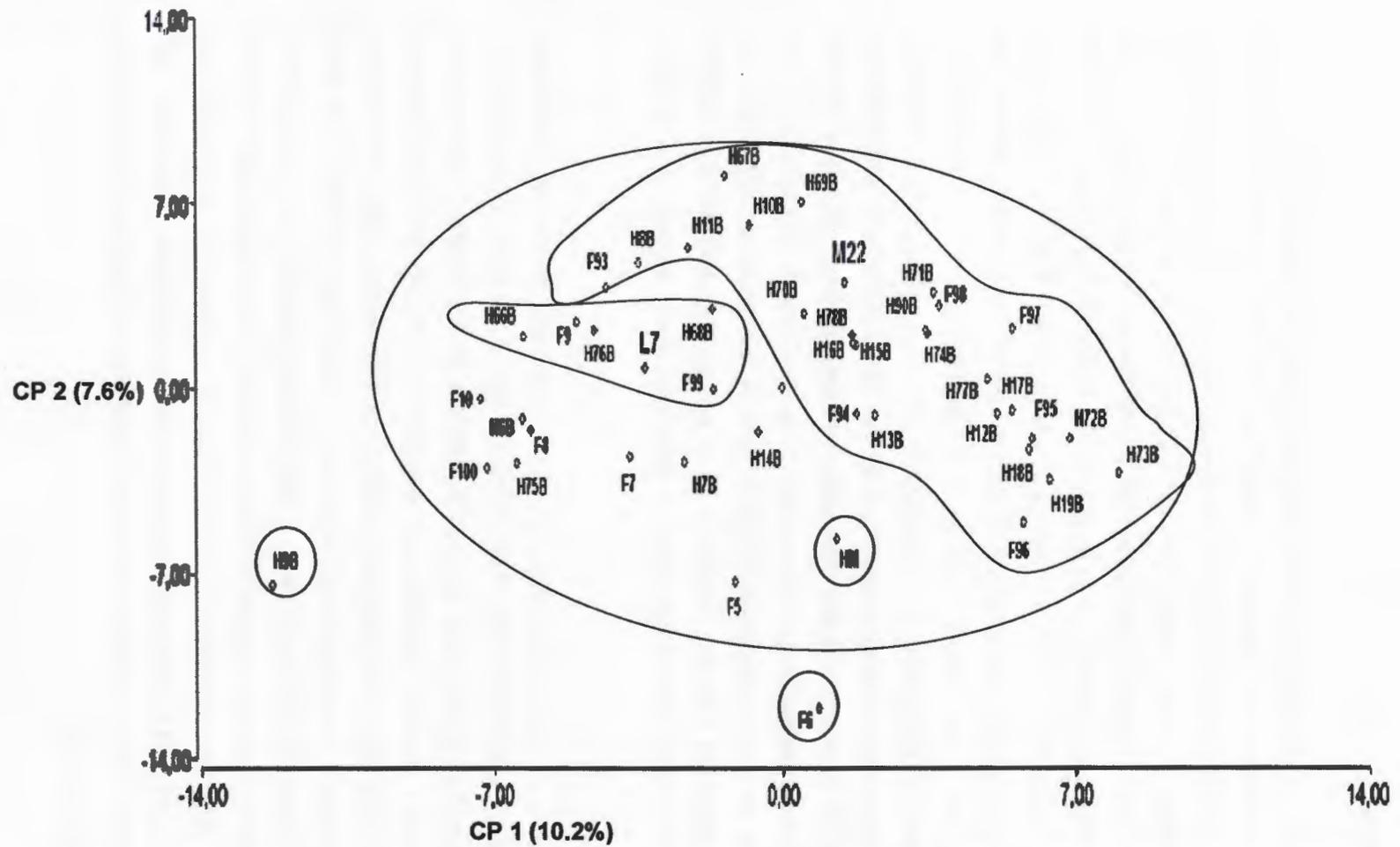


Figura 4.5. Gráfico biplot estimado con 217 marcadores AFLP usando la matriz de similitud genética de DICE para 45 genotipos de *Carica papaya* L. Parentales: L7 y M22, individuos F1 hermafroditas: H6B a H90B, individuos F1 femeninos F5-F100, individuo F1 masculino: HM.

IV.6. DISCUSION

En poblaciones de *Carica papaya* L. la caracterización agro-morfológica generalmente es la forma más accesible para estimar la variabilidad genética, siendo esencial para discriminar o identificar genotipos dentro de un pool genético con fines de mejoramiento genético de la especie (Olivera *et al.*, 2011). Al respecto, en esta investigación se pudo estimar la variabilidad genética morfológica en 28 individuos hermafroditas F1 y los parentales L7 y M22. La correlación de similitud genética morfológica promedio entre todos los genotipos F1 fue de 0.446 y 0.471, respecto a L7 y M22 (Cuadro 4.9). Cabe resaltar que se observó una tendencia de agrupamiento de los individuos F1 segregantes ya sea hacia el parental L7 o hacia el parental M22 (Figura 4.1). De tal manera que los 13 genotipos F1 que se agruparon con el parental L7 comparten el 55% de similitud en sus caracteres morfológicos, mientras que aquellos 15 genotipos F1 que se agruparon con el parental M22 comparten el 63.3% de similitud en sus caracteres morfológicos. Esto indica que entre los genotipos de papaya evaluados existe una variabilidad morfológica contrastante, la cual podría servir de fuente de diversidad genética para la búsqueda de parentales con características deseables y puedan emplearse en un esquema de mejoramiento genético de papaya para obtener nuevas variedades o genotipos mejor adaptados a la región (Martínez *et al.*, 2003).

Las combinaciones de marcadores AFLP con mejor porcentaje de bandas polimórficas fueron E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CTA, E-ACT/M-CGA, con un valor de 72.73%, 61.74% y 51.35% de fragmentos polimórficos, las cuales pudieran ser empleadas en estudios de variabilidad genética en otros morfotipos de papaya con el fin de apoyar los estudios morfológicos, o para apoyar los estudios genéticos o para acelerar los programas de mejoramiento genético de la especie (Esquivel *et al.*, 2009; Meerow, 2005). Los datos obtenidos de fragmentos polimórficos y monomórficos mediante las combinaciones anteriores permitieron obtener una correlación de similitud genética molecular promedio entre todos los genotipos evaluados de 0.652, la cual se comparó con la correlación de similitud genética de 0.512 obtenida en la caracterización morfológica, este último dato indicó que persiste una gran variación en algunos caracteres morfológicos principalmente del fruto y el tipo de planta.

La comparación de la matriz de correlación de similitud genética morfológica y molecular se enfocó solamente en aquellos genotipos hermafroditas segregantes de los parentales L7 y M22. De tal manera que de los 28 genotipos F1 tipo hermafroditas 13 mantuvieron una correlación de similitud genética promedio de 0.668 con el parental L7, mientras que 15 mantuvieron una correlación de similitud genética promedio de 0.702 con el parental M22 respecto a los caracteres morfológicos evaluados. En la caracterización molecular cinco individuos hermafroditas quedaron en grupos externos (H6B, H7B, H9B, H14B H75B), mientras que solamente tres genotipos hermafroditas F1 fueron segregantes del parental L7 y tuvieron una correlación de similitud genética molecular de 0.669, y los 20 genotipos hermafroditas F1 segregantes del parental M22 mostraron una correlación de similitud genética molecular de 0.704.

Los caracteres agro-morfológicos mostraron ligeramente una mayor variabilidad genética que la obtenida con los marcadores AFLP. Sin embargo, la similitud genética presente solo en los genotipos segregantes de cada parental fue muy similar y permitió conocer que más del 50% de los genotipos hermafroditas fueron genéticamente similares al parental M22. Como se esperaba los datos anteriores indican que dentro de la población evaluada la diversidad agromorfológica y la diversidad genética molecular no se ve disminuida debido a que la población evaluada proviene de dos parentales con caracteres contrastantes. Además existe una asociación entre ambos patrones o sistemas de evaluación de diversidad genética. Dado que la evaluación fue en una población F1, en principio, con este análisis molecular mediante AFLP en *Carica papaya* L. se podría apoyar en la selección de progenitores genéticamente distantes y complementarios para mantener la diversidad genética, o bien para obtener progenies superiores "elite" con caracteres de interés en cuanto a color y tamaño del fruto.

Al respecto, (Esquivel *et al.*, 2009), encontraron que el coeficiente de similitud de DICE tuvo un valor de 0.545 para *Carica papaya* L. colectadas en diferentes regiones de Sudamérica. Mientras que (Oliveira *et al.*, 2011), reportaron un valor medio de distancia genética media de 0.735 en genotipos de papaya cultivada, líneas mejoradas y germoplasma mejorado. Por su parte, (Vegas *et al.*, 2013), reportaron y clasificaron como correlación de similitud media al dato encontrado de 0.899 en 28 genotipos accesiones de *Carica papaya* L. del germoplasma Venezolano; datos similares reportaron (Van Droogenbroeck *et al.*, 2002),

quienes obtuvieron una correlación de similitud de 0.873 en accesiones de papaya provenientes de Ecuador. A su vez, (Janthasri *et al.*, 2007), reportaron una correlación de similitud de 0.920 y mencionan que estos materiales de papaya desarrolladas en Tailandia presentan poca variabilidad genética quizá porque fueron generados a partir de materiales de un mismo banco de germoplasma. Y coincide con los datos de similitud obtenidos por (Kim *et al.*, 2002), siendo de 0.921 dentro de papayas Hawaianas y de 0.914 dentro de accesiones de papaya Australianas, las cuales exhiben poca diversidad genética debido a que son materiales que provienen de un mismo pool genético.

Los datos reflejan que nuestro germoplasma se mantiene con una variabilidad genética media a alta en algunos materiales de papaya evaluados. Variabilidad que fue explorada eficientemente con la técnica molecular de AFLP y con la que se identificó el agrupamiento de aquellos genotipos con una alta variabilidad genética semejante con el parental Línea 7 (Criollo), y aquellos genotipos con variabilidad genética media semejante con el parental M22. Con la obtención de la huella genética en materiales contrastantes de papaya tal como los progenitores L7, M22 y progenie F1 se dio el primer paso para buscar o cartografiar en un futuro algunos QTLs asociados a algún carácter morfológico de interés. Es decir, se pudo identificar que existe una variabilidad genética que permite la selección dentro de la población F1 evaluada de genotipos que poseen las características de interés para generar poblaciones F2 o utilizarlos para retrocruzas con alguno de los parentales (L7 o M22), quienes posteriormente pueden someterse nuevamente al análisis molecular mediante AFLP para explorar la cosegregación de marcadores polimórficos respecto a algún carácter en particular, con el fin de obtener nuevos QTL.

IV.7. CONCLUSIONES

La correlación de similitud agro-morfológica promedio de L7 (0.668) y de M22 (0.702), respecto a los individuos F1 segregantes y agrupados a cada uno de esos parentales, indicaron que entre los genotipos de *Carica papaya* L. evaluados existe una variabilidad genética morfológica de media a alta que podría servir como base en la búsqueda de nuevos parentales con características que puedan emplearse en un esquema de mejoramiento genético de papaya para obtener nuevas variedades o genotipos mejor adaptados a la región.

La correlación de similitud genética promedio de L7 de 0.669 y la correlación de similitud genética promedio de M22 de 0.704, respecto a los individuos F1 segregantes y agrupados a cada uno de esos parentales y obtenida mediante marcadores AFLP, reveló que entre los genotipos evaluados de *Carica papaya* L. existe una variabilidad genética media a alta que se asocia con la variabilidad agro-morfológica media a alta obtenida. Con lo que se confirmó mediante los dos sistemas de evaluación que existe un nivel medio a alto de diversidad genética dentro de la población F1 evaluada útil para la selección de genotipos *elite* genéticamente distantes o complementarios, los cuales podría generar poblaciones F2 o retrocruzas para mantener la variabilidad genética y con las que se podría contribuir en la búsqueda de nuevos QTL asociados a caracteres agro-morfológicos en papaya.

Las combinaciones de iniciadores de marcadores AFLP con mejor porcentaje de bandas polimórficas fueron E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CTA y E-ACT/M-CGA (72.73%, 61.74% y 51.35% de polimorfismo, respectivamente), las cuales pudieran ser empleadas en estudios de diversidad genética en otros morfotipos de papaya con el fin de auxiliar los estudios agro-morfológicos en la búsqueda de marcadores AFLP asociados a algún carácter de interés económico para acelerar los programas de selección y mejoramiento genéticos de la especie.

IV.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Colunga, G. M. y V. D. Zizumbo (2004). Domestication of plants in Maya lowlands. *Economic Botany*, 58, 101-110.
- Esquivel, M. A., A. M. Bautista, G. M. Ortiz, A. Quiroz, W. Rohde y T. L. F. Sánchez (2009). Caracterización de accesiones de papaya (*Carica papaya* L.) a través de marcadores AFLP en Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 31-39.
- Eustice, M., Q. Yu, Ch. Wan Lai, S. Hou, J. Thimmpuram, L. Liu, M. Alam, P. H. Moore, G. G. Presting y R. Ming (2008). Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. *Tree genetics and genome*, 4, 333-341.
- Janthasri, R., S. Katengam y U. Khumcha (2007). An analysis on DNA fingerprints of thirty papaya cultivars (*Carica papaya* L.) Grown in Thailand with the use of Amplified Fragments Length Polymorphisms Technique. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 3072-3072.
- Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. Van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatte, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli y A. Karp (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3, 381-390.
- Kim, M. S., P. H. Moore, F. Zee, M. M. M. Fitch, D. L. Steiger y R. M. Manshardt (2002). Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, 45, 503-512.
- Liu, Z., P. H. Moore, H. Ma, C. M. Ackerman, M. Ragiba, Q. Yu, H. M. Pearl, M. S. Kim, J. W. Charlton, J. I. Stiles, F. T. Zee, A. H. Paterson y R. Ming (2004). A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*, 427(6972), 348-352.
- Madarbokus, S. y V. M. Ranghoo-Sanmukhiya (2012). Identification of genetic diversity among Papaya varieties in mauritius using morphological and molecular markers. *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*. 1(4), 152-164.

- Martínez, L., P. Cavagnaro, R. Masuelli y J. Rodríguez (2003). Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 244-253.
- Meerow, W. A. (2005). Molecular genetic characterization of new Floricultural germplasm. *Acta Horticulturae*, 683, 42-63.
- Moore, P. H. (2014). Chapter 3: Phenotypic and genetic diversity of papaya: Crops and Models. *Spinger*, 10, 35-45.
- Mueller, U. G. y L. Wolfenbarger (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*, 14, 389-393.
- Ocampo, J. P., G. C. d'Eeckenbrugge, S. Bruyere, L. L. De Bellaire y P. Ollitrault (2006). Organization of morphological and genetic diversity of Caribbean and Venezuela papaya germplasm. *Fruits*, 61, 25-37.
- Oliveira, E. J., C. J. Leles, D. S. Ferraz, F. C. Moraes, S. A. Santos y D. J. L. Loyola (2011). Molecular characterization of papaya genotypes using AFLP markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 848-858.
- Rojas, L. E., J. López, R. G. Kosky y O. Portal (2007). Empleo de los marcadores AFLP para la caracterización molecular de dos cultivos con interés agrícola. *Biología Vegetal*, 7, 103-106.
- Sudha, R., D. R. Singh, M. Sankaran, V. Damodaran y P. Simachalam (2013). Genetic diversity analysis of papaya (*Carica papaya* L.) genotypes in Andaman Islands using morphological and molecular markers. *African Journal Biotechnology*, 8(41), 5187-5192.
- Van Droogenbroeck, B., P. Breyne, P. Goetghebeur, P. E. Romeijn, T. Kyndt y G. Gheysen (2002). AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theoretical Applied Genetics*, 105, 289-297.
- Vegas, G. A., A. Miliani, D. Rodríguez, A. Zambrano, V. J. L. Vicente y J. R. Demey (2013). Diversidad genética de la colección Venezolana de la familia Caricáceas. *Interciencia*, 38, 171-178.
- Vos, P. R., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Fijters, J. Pot, M. Kuiper y M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.

Yu, Q. Y., P. R. Navajas, E. Tong, J. Robertson, P. H. Moore, A. H. Paterson y R. Ming (2008). Recent origin of dioecious and gynodioecious Y chromosomes in papaya. *Tropical Plant Biology*, 1, 49-57.

CAPITULO V

V.1. DISCUSIÓN GENERAL

La caracterización agro-morfológica de plantas se basa tradicionalmente en evaluaciones de caracteres morfológicos y fenotípicos que suelen ser necesarias y útiles para la identificación de individuos *elite* con caracteres valiosos destinados a los programas de mejoramiento genético o programas de conservación (Solano *et al.*, 2009). Al respecto la UPOV (2010), reportó una serie de descriptores morfológicos para papaya. En la presente tesis estos fueron evaluados, analizados y agrupados mediante herramientas estadísticas univariadas y multivariadas (componentes principales y de conglomerados) para conocer la variabilidad genética existentes entre parentales L7, M22 y su progenie F1 y F2 provenientes de la cruce intraespecífica L7xM22 *Carica papaya* L. La aplicación de este recurso de análisis estadístico apoyó en la decisión para la elección y la selección de progenie (F1 y F2) *elite* que fueron incluidos en el programa de mejoramiento genético de papaya del CICY.

Actualmente, la asociación entre un carácter agromorfológico y la caracterización molecular es ampliamente usada para estimar la variabilidad existente en el conjunto de individuos evaluados; de tal manera que con la información genética obtenida se pueda establecer su correlación morfológica correspondiente (Franco e Hidalgo, 2003). Es decir, aquellos estudios que incorporen descriptores morfológicos y marcadores moleculares proveerán una mejor y rápida descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos (Demey *et al.*, 2003).

Entre las técnicas basadas en marcadores moleculares más usadas para evaluar la variabilidad genética de *Carica papaya* L. se han reportado los AFLP, RAPD y SSR (Blas, 2008; Rajeswari, 2004; Suresh, 1994), que han sido exitosas para detectar el polimorfismo presente en esta especie, para la detección de nuevos QTLs, o para conocer la segregación genética en nuevas poblaciones de la especie. Un porcentaje de polimorfismo alto es muy importante ya que ayuda a detectar diferencias genéticas entre individuos a nivel de ADN, a través de un marcador genético, el cual es una fragmento del DNA (QTL) que puede estar asociado a un gen que influye sobre una característica cuantitativa de interés (Valadez y

Kahl, 2000). El marcador QTL constituye una herramienta muy útil para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético tradicionales; dando lugar a su implementación en la selección asistida por marcadores moleculares, a su vez, una disminución en la demanda de tiempo y recursos en los estudios encaminados en la selección de genotipos elites (Valdés *et al.*, 2003).

En esta investigación se pudo constatar que los marcadores de DNA 'QTL' tipo microsatélites (SSR) que fueron originalmente asociados a la morfología del fruto en papaya Hawaiana presentaron condición codominante, polimórfica y un comportamiento de segregación mendeliana esperado, sin embargo, la información molecular obtenida no se asoció con los datos morfológicos de longitud, peso, diámetro y forma del fruto en los genotipos de *Carica papaya* L. var. Maradol evaluados en esta tesis. La falta de asociación entre los QTL y los marcadores morfológicos pudo deberse a que la evaluación fue entre morfotipos diferentes de papaya, es decir, que a pesar de haber sido reportados y asociados a caracteres de tamaño de fruto en papaya Hawaiana, estos QTL no están asociados a los mismos caracteres morfológicos de fruto en *Carica papaya* L. var. Maradol.

Cabe mencionar que estos caracteres morfológicos además del medio ambiente, también están influenciados por la interacción de dos o más genes (poligénicos) (Obando y Fernández, 2008). Los genes *sun*, *ovate* y *fw.2.2* presentes en el genoma de tomate y en regiones ortólogas en el genoma de papaya, cuya función es la de regular la elongación temprana del pericarpio del ovario, la elongación del pericarpio del ovario después de la fertilización y la división celular y desarrollo de fruto, respectivamente. (Blas *et al.*, 2012; Paull *et al.*, 2008), tienen una mínima aportación genética que influye directamente sobre los caracteres cuantitativos de longitud, peso, diámetro de fruto, mismos que pudieran asociarse a varios marcadores moleculares de DNA (QTL) y entre ellos proporcionar algunos que no guarden una estrecha relación con el carácter de interés, quizá esa sea una de las razones por lo que los ocho QTL evaluados en esta investigación no fueron asociados a ningún carácter de tamaño de fruto en *Carica papaya* L. var. Maradol.

En cambio, con los marcadores moleculares CPM1815CY2 y CPF1 asociados al tipo sexual y color de pulpa, respectivamente, e influenciados por genes de función específica (unigénicos), la validación fue exitosa ya que la variación molecular dentro de los genes que controlan funciones específicas (unigénico) puede proporcionar marcadores

moleculares de DNA (QTL) que están estrechamente relacionados con el carácter de interés (Nagaraja *et al.*, 2012). El marcador CPM1815CY2 logró ser útil para identificar plantas hermafroditas y femeninas en estado de plántula en una proporción esperada y confirmada morfológicamente de 2:1. Mientras que con el marcador CPF1 se garantiza la identificación de genotipos con un color de pulpa naranja-rojizo, por lo tanto, ambos marcadores QTL pueden ser utilizados como una herramienta en la Selección Asistida por Marcadores Moleculares en *Carica papaya* L. var. Maradol (SAM) (Blas *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2007). Actualmente, la selección asistida por marcadores moleculares en papaya se aplica en la detección del tipo sexual mediante marcadores tipo SCAR y RAPD, además, en la identificación de plantas transgénicas con tolerancia al virus de la macha anular de papaya (Chaves y Nuñez, 2007; Deputy *et al.*, 2002; Tennant *et al.*, 1994; Fitch *et al.*, 1990). La contribución de este trabajo a la SAM en papaya es la implementación de los marcadores CPM1815CY2 y CPF1.

La obtención de la huella genética de los progenitores y la descendencia de cruza entre materiales contrastantes es el primer paso para la cartografía de nuevos QTLs. Este requisito se cumple en los genotipos parentales L7 y M22 evaluados quienes fueron contrastantes en el color, tamaño y forma del fruto de papaya, no obstante, generar poblaciones F2 o bien retrocruzas e incluir nuevas combinaciones de iniciadores de marcadores AFLP para poder extraer mayor información genética de los genotipos evaluados será necesario para poder explorar y determinar aquellos QTL que estén asociados a las características de interés. Se prestó particular interés al dato de similitud genética de los genotipos F1 seleccionados H90B, H77B y H70B, cuyos valores fueron 0.640, 0.610 y 0.650, respectivamente en correlación con L7. Los valores fueron 0.750, 0.710 y 0.760, respectivamente en correlación con M22. Con ello se puede constatar que poseen una variabilidad genética media, sin embargo los genotipos F1 son más cercanos genéticamente al parental Maradol 22 (Comercial), mientras que estos genotipos F1 son genéticamente más distantes respecto al parental Línea 7 (Criolla). Al respecto, (Brown *et al.*, 2012) reportaron que en las poblaciones silvestres los niveles de diversidad genética son más altos y que aquellos materiales de papaya cultivados (Comercial) muestran una deficiencia de heterocigotos, por lo tanto una correlación alta de similitud entre ellos.

V.2. CONCLUSIÓN GENERAL

La variabilidad observada en los caracteres morfológicos del fruto tales como los componentes de color (*L*, *a*, *b*, *h* y *C*), y dimensiones del fruto tales como PF, LF y DF, fueron útiles para identificar y agrupar mediante el análisis multivariado de conglomerados y componentes principales aquellos individuos según el color de pulpa y el tamaño del fruto dentro de la progenie F1 y F2. Permitiendo la elección y selección fenotípica de los individuos en la F1 de: H90B, H77B, y H70B, y los individuos en la F2 de: H90-32, H70-18, H70-25 y H70-50 quienes reúnen las características morfológicas del fruto de interés y útiles en el programa de mejoramiento genético de papaya del CICY para mejorar el color y tamaño del fruto.

Con los marcadores moleculares CPM1815CY2 y CPF1 asociados al tipo sexual y color de pulpa, respectivamente, e influenciados por genes de función específica (unigénicos), la validación fue exitosa ya que el marcador CPM1815CY2 logró ser útil para identificar plantas hermafroditas y femeninas en estado de plántula en una proporción esperada y confirmada morfológicamente de 2:1. Mientras que con el marcador CPF1 se garantiza la identificación de genotipos con un color de pulpa naranja-rojizo, por lo tanto, ambos marcadores QTL pueden ser utilizados como una herramienta en la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) en *Carica papaya* L. var. Maradol. Por el contrario, los ocho marcadores moleculares SSR (QTL) que originalmente se habían asociado a longitud, peso, diámetro y forma de fruto en papaya Hawaiana, no presentaron un patrón diferencial entre el marcador QTL y los caracteres de longitud, peso, diámetro y forma de fruto en *Carica papaya* L. var. Maradol.

La técnica molecular de AFLP fue eficiente para detectar alto grado de polimorfismo en la población F1 y parentales L7 y M22 de *Carica papaya* L. mediante las combinaciones E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CTA y E-ACT/M-CGA, cuyos resultados moleculares permitieron conocer la correlación de similitud genética molecular media de L7 (0.669) y de M22 (0.704), respecto a los individuos F1 segregantes y agrupados a cada uno de esos parentales. Concluyendo que entre los genotipos de papaya evaluados existe una variabilidad genética molecular media a alta que se asocia con una similar variabilidad agro-morfológica; relación que podría favorecer en un futuro la búsqueda de nuevos QTL asociados a caracteres morfológicos dentro de poblaciones F2 o retrocruzas de *Carica papaya* L. var. Maradol.

V.3. PERSPECTIVAS

Los estudios obtenidos en esta tesis servirán de base para la realización de futuras investigaciones orientadas a:

En principio, se deben purificar mediante autocruzas las Líneas Criollas de papaya que se tienen en el banco de germoplasma, por lo menos dos ciclos más. Y someter las Líneas purificadas a diferentes ambientes para su desarrollo y análisis agromorfológico y molecular.

Realizar las cruzas dirigidas con los materiales que reúnan las características contrastantes de interés para generar las poblaciones F1 y posteriormente F2 o retrocruzas, las cuales también deberán ser sometidas al análisis agromorfológico y molecular.

Realizar un screening de mayor densidad con nuevas combinaciones de iniciadores de marcadores AFLP.

Generar mapas de QTL con los datos del marcador morfológico de interés y los datos de los marcadores moleculares utilizados.

Generar nuevos QTLs para la morfología del fruto (longitud, peso, diámetro, forma, grosor de pulpa) en *Carica papaya* L. var. Maradol.

Generar los QTLs para iniciar la SAM para otros caracteres como tolerancia a factores bióticos y abióticos y para seleccionar materiales con mejores contenidos nutricionales y nutraceuticos en *Carica papaya* L.

V.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blas, A. L. (2008). Molecular genetic basis of papaya fruit traits. Thesis in doctor of philosophy in molecular biosciences and bioengineering. University of Hawaii. 185 p.
- Blas, A. L., Q. Yu, O. J. Veatch, E. Robert, H. M. Paull y R. Ming. (2012). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. *Molecular Breeding*, 29(2), 457-466.
- Blas, A., R. Ming, Z. Liu, O.J. Veatch, E. Robert, H. Paull y Q. Yu (2010). Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene β -Cyclase, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination Hot Spot. *Plant Physiology*, 152, 2013-2022.
- Brown, J. E., J. M. Bauman, J. F. Lawrie, O. J. Rocha y R. C. Moore (2012). The structure of morphological and genetic diversity in natural populations of *Carica papaya* L. (Caricaceae) in Costa Rica. *Biotropica*, 44, 179-188.
- Chaves B. G. y V. Nuñez (2007). A SCAR marker for the sex types determination in Columbian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica*, 153, 215-220.
- Chen, C., Q. Yu, S. Hou, Y. Li, M. Eustice, R. L. Skelton, O. Veatch, R. E. Herdes, L. Diebold, J. Saw, Y. Feng, W. Qian, L. Bynum, L. Wang, P. Moore, R. E. Paull, M. Alam y R. Ming (2007). Construction of a sequence tagged high density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in brassicales. *Genetics*, 177, 2481-2491.
- Deputy, J. C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt y J. I. Stiles (2002). Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.) *Theoretical Applied Genetics*, 106(1), 107-111.
- Fitch, M. M., R. M. Manshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom y J. C. Sanford (1990). Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 9, 189-194.
- Nagaraja, R., R. Reddy, S. Madhusudhana, M. Murali, D. V. N. Chakravarthi y N. Seetharama (2012). Characterization, development and mapping of Unigene-derived microsatellite markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Molecular Breeding*, 29, 543-564.

- Obando, J., T. J. P. Fernández, J. A. Martínez, A. L. Alarcón, I. Eduardo, P. Arús y A. J. Monforte (2008). Identification of melon fruit quality quantitative trait loci using near-isogenic lines. *Journal of the America Society for Horticultural Science*, 133, 139-151.
- Paull, R. E., B. Irikura, P. Wu, H. Turano, N. J. Chen, A. Blas, J. K. Fellman, A. R. Gschwend, C. M. Wai, Q. Yu, G. Presting, M. Alam y R. Ming (2008). Fruit development, ripening and quality related genes in the papaya genome. *Tropical Plant Biology*, 1, 246–277.
- Rajeswari, K. S. (2004). Construction of an AFLP linkage map and analysis of QTLs for economic traits in papaya (*Carica papaya* L.). Thesis in doctor of philosophy in Horticulture. University of Hawaii. 174 p.
- Solano, F. G., C. M. P. Márquez y I. Schuler (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. *Universitas Scientiarum*, 14, 1-7.
- Suresh, N. S. (1994). Construction of a genetic linkage map of papaya and mapping traits of horticultural importance. Thesis in doctor of philosophy in Horticulture. University of Hawaii. 196 p.
- Tennant, P. F., C. Gonsalves, K. S. Ling, M. Fitch, R. Manshardt, J. L. Slightom y D. Gonsalves (1994). Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology*, 84, 1359-1366.
- UPOV, (2010). International union for the protection of new varieties of plants. Papaya UPOV Code: Caric_pap *Carica papaya* L. 32 p.
- Valadéz, M. E. y G. Kahl (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas: teorías y protocolos. Universidad Autónoma Chapingo. Mundi Prensa. México, D.F. 164 p.
- Valdés, I. J. y N. N. Rodríguez (2003). Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales tropicales. FAO, [http//fao.cubasi.cu](http://fao.cubasi.cu), 25 p.

ANEXOS

Anexo I Cuadro 3.5 Datos de la salida generada por el programa bioinformático perfectBlast (Santiago y Ramírez, 2012) útiles para el cálculo *in silico* del tamaño de fragmento esperado de marcadores de DNA 'QTLs' asociados a la morfología de flor y fruto en *Carica papaya* L.

# Query: CPM1815YC2												
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 2 hits found												
CPM1815YC2_(F)	gi 187572596 gb DS981586.1	100	20	0	0	1	20	823817	823798	0.006	37.4	
CPM1815YC2_(F)	gi 187574662 gb DS981520.1	100	15	0	0	3	17	2E+06	1873030	2.9	28.3	
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 3 hits found												
CPM1815YC2_(R)	gi 187572596 gb DS981586.1	100	20	0	0	1	20	823631	823650	0.006	37.4	
CPM1815YC2_(R)	gi 187574652 gb DS981530.1	100	18	0	0	3	20	947068	947085	0.069	33.7	
CPM1815YC2_(R)	gi 187567282 gb DS982747.1	90	20	2	0	1	20	2945	2926	2.9	28.3	
# Query: Fc.1F.1R												
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 1 hits found												
Fc.1F.1R_(F)	gi 187570467 gb DS981715.1	100	20	0	0	1	20	96770	96789	0.006	37.4	
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 2 hits found												
Fc.1F.1R_(R)	gi 187570467 gb DS981715.1	100	20	0	0	1	20	97357	97338	0.006	37.4	
Fc.1F.1R_(R)	gi 187572575 gb DS981607.1	100	15	0	0	6	20	307000	306986	2.9	28.3	
# Query: P6K1472C0												
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 3 hits found												
P6K1472C0_(F)	gi 187570237 gb DS981945.1	100	20	0	0	1	20	33629	33610	0.006	37.4	
P6K1472C0_(F)	gi 187572586 gb DS981596.1	94.44	18	1	0	1	18	1E+06	1108849	2.9	28.3	
P6K1472C0_(F)	gi 187572624 gb DS981558.1	100	15	0	0	4	18	1E+06	1111612	2.9	28.3	
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 6 hits found												
P6K1472C0_(R)	gi 187570237 gb DS981945.1	100	20	0	0	1	20	33454	33473	0.006	37.4	
P6K1472C0_(R)	gi 187566885 gb DS983063.1	100	16	0	0	5	20	6138	6123	0.84	30.1	
P6K1472C0_(R)	gi 187570485 gb DS981697.1	100	16	0	0	5	20	479160	479175	0.84	30.1	
P6K1472C0_(R)	gi 187574652 gb DS981530.1	100	16	0	0	5	20	2E+06	1975272	0.84	30.1	
P6K1472C0_(R)	gi 187574630 gb DS981552.1	90	20	2	0	1	20	26660	26679	2.9	28.3	
P6K1472C0_(R)	gi 187574642 gb DS981540.1	94.44	18	1	0	3	20	122524	122507	2.9	28.3	
# Query: P6K268CC												
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score	
# 3 hits found												
P6K268CC_(F)	gi 187570393 gb DS981789.1	100	20	0	0	1	20	37333	37314	0.006	37.4	

# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 5 hits found											
P6K268CC_(R)	gi 187570393 gb DS981789.1	95.45	22	0	1	1	22	37155	37179	0.24	31.9
P6K268CC_(R)	gi 187572523 gb DS981659.1	94.44	18	1	0	5	22	11887	11888	2.9	28.3
P6K268CC_(R)	gi 187572549 gb DS981633.1	100	15	0	0	2	16	622072	622058	2.9	28.3
P6K268CC_(R)	gi 187572564 gb DS981618.1	100	15	0	0	2	16	251323	251309	2.9	28.3
P6K268CC_(R)	gi 187574652 gb DS981530.1	94.44	18	1	0	4	21	2E+06	1906630	2.9	28.3
# Query: P3K1700CC											
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 3 hits found											
P3K1700CC_(F)	gi 187574655 gb DS981527.1	100	20	0	0	1	20	2E+06	1519075	0.006	37.4
P3K1700CC_(F)	gi 187574632 gb DS981550.1	100	15	0	0	6	20	2E+06	1649169	2.9	28.3
P3K1700CC_(F)	gi 187574653 gb DS981529.1	100	15	0	0	3	17	1E+06	1264772	2.9	28.3
# Query: Rpeso3											
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 3 hits found											
P3K1700CC_(R)	gi 187574655 gb DS981527.1	100	20	0	0	1	20	2E+06	1519075	0.006	37.4
P3K1700CC_(R)	gi 187572601 gb DS981581.1	100	15	0	0	5	19	81652	81652	2.9	28.3
P3K1700CC_(R)	gi 187574660 gb DS981522.1	100	15	0	0	4	18	3E+06	2504914	2.9	28.3
# Query: Fdiam1											
# Query: ctg-43C0											
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 8 hits found											
ctg-43C0_(F)	gi 187574656 gb DS981526.1	100	20	0	0	1	20	3E+06	31033975	0.006	37.4
ctg-43C0_(F)	gi 187572583 gb DS981599.1	94.74	19	1	0	2	20	1E+06	4153045	0.84	30.1
ctg-43C0_(F)	gi 187574632 gb DS981550.1	94.74	19	1	0	2	20	2E+06	1633586	0.84	30.1
ctg-43C0_(F)	gi 187570300 gb DS981882.1	94.44	18	1	0	1	18	43382	43399	2.9	28.3
ctg-43C0_(F)	gi 187571507 gb DS981675.1	94.44	18	1	0	2	19	185614	185597	2.9	28.3
ctg-43C0_(F)	gi 187572528 gb DS981654.1	100	15	0	0	3	17	611193	611179	2.9	28.3
ctg-43C0_(F)	gi 187572552 gb DS981630.1	94.44	18	1	0	2	19	1E+06	1E+06	2.9	28.3
ctg-43C0_(F)	gi 187572573 gb DS981609.1	100	15	0	0	3	17	601496	601510	2.9	28.3
# Query: ctg-43C0											
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 1 hits found											
ctg-43C0_(R)	gi 187574656 gb DS981526.1	100	20	0	0	1	20	3E+06	31033975	0.006	37.4
# Query: P3K2112K0											
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 5 hits found											
P3K2112K0_(F)	gi 187572611 gb DS981571.1	100	22	0	0	1	22	104195	104216	5E-04	41
P3K2112K0_(F)	gi 187572514 gb DS981668.1	100	15	0	0	7	21	325224	325938	2.9	28.3
P3K2112K0_(F)	gi 187572551 gb DS981631.1	100	15	0	0	7	21	670268	670282	2.9	28.3
P3K2112K0_(F)	gi 187574648 gb DS981534.1	94.44	18	1	0	1	18	2E+06	1570144	2.9	28.3
P3K2112K0_(F)	gi 187574659 gb DS981523.1	100	15	0	0	8	22	3E+06	3465644	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Value	Bit score
# 4 hits found											
P3K2112K0_(R)	gij187572611 gb DS981571.1	100	22	0	0	1	22	104389	104368	5E-04	41
P3K2112K0_(R)	gij187566743 gb DS983205.1	100	15	0	0	4	18	12422	12408	2.9	28.3
P3K2112K0_(R)	gij187572555 gb DS981627.1	100	15	0	0	6	20	695495	695481	2.9	28.3
P3K2112K0_(R)	gij187572600 gb DS981582.1	100	15	0	0	8	22	883045	883059	2.9	28.3
# Query: CPM1556C0											
# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Value	Bit score
# 14 hits found											
CPM1556C0_(F)	gij187567534 gb DS982555.1	100	23	0	0	1	23	21122	21100	1E-04	42.8
CPM1556C0_(F)	gij187572609 gb DS981573.1	90.91	22	2	0	2	23	671237	671258	0.24	31.9
CPM1556C0_(F)	gij187572611 gb DS981571.1	91.67	24	0	1	2	23	553375	553352	0.24	31.9
CPM1556C0_(F)	gij187574640 gb DS981542.1	90.48	21	2	0	2	22	1E+06	1411240	0.84	30.1
CPM1556C0_(F)	gij187574645 gb DS981537.1	100	16	0	0	8	23	1E+06	1429954	0.84	30.1
CPM1556C0_(F)	gij187569987 gb DS982195.1	100	15	0	0	9	23	3199	3213	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187572523 gb DS981659.1	100	15	0	0	9	23	28751	28765	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187572534 gb DS981648.1	100	15	0	0	4	18	782219	782233	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187572539 gb DS981643.1	100	15	0	0	4	18	444892	444878	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187572595 gb DS981587.1	100	15	0	0	9	23	86843	86857	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187572615 gb DS981567.1	94.44	18	1	0	5	22	218291	218274	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187572624 gb DS981558.1	100	15	0	0	9	23	1E+06	1415736	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187574649 gb DS981533.1	100	15	0	0	6	20	1E+06	1449400	2.9	28.3
CPM1556C0_(F)	gij187574661 gb DS981521.1	100	15	0	0	9	23	2E+06	2190412	2.9	28.3
# Fields: query id											
# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Value	Bit score
# 4 hits found											
CPM1556C0_(R)	gij187567534 gb DS982555.1	100	21	0	0	1	21	20944	20964	0.002	39.2
CPM1556C0_(R)	gij187572528 gb DS981654.1	94.44	18	1	0	2	19	489438	489455	2.9	28.3
CPM1556C0_(R)	gij187572532 gb DS981650.1	100	15	0	0	2	16	195642	195656	2.9	28.3
CPM1556C0_(R)	gij187574647 gb DS981535.1	94.44	18	1	0	2	19	2E+06	2039395	2.9	28.3
# Query: P3K4311bK0											
# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Value	Bit score
# 5 hits found											
P3K4311bK0_(F)	gij187574643 gb DS981539.1	100	21	0	0	1	21	2E+06	1824961	0.002	39.2
P3K4311bK0_(F)	gij187570346 gb DS981836.1	100	16	0	0	4	19	14843	14828	0.84	30.1
P3K4311bK0_(F)	gij187574651 gb DS981531.1	100	16	0	0	2	17	456027	456012	0.84	30.1
P3K4311bK0_(F)	gij187572614 gb DS981568.1	100	15	0	0	1	15	367307	367321	2.9	28.3
P3K4311bK0_(F)	gij187572614 gb DS981568.1	100	15	0	0	1	15	373786	373800	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 31 hits found											
P3K4311bK0_(R)	gij187574643 gb DS981539.1	100	23	0	0	1	23	2E+06	1824805	1E-04	42.8
P3K4311bK0_(R)	gij187573627 gb DS981555.1	95	20	1	0	3	22	1E+06	1367315	0.24	31.9
P3K4311bK0_(R)	gij187574652 gb DS981530.1	95	20	1	0	3	22	2E+06	1824958	0.24	31.9
P3K4311bK0_(R)	gij187566835 gb DS983113.1	90.48	21	2	0	3	23	11576	11596	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187570086 gb DS982096.1	100	16	0	0	5	20	20869	20854	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187570418 gb DS981764.1	100	16	0	0	8	23	21653	21638	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187570449 gb DS981733.1	94.74	19	1	0	5	23	186962	186980	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187574628 gb DS981554.1	90.48	21	2	0	3	23	28674	28654	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187574649 gb DS981533.1	100	16	0	0	4	19	2E+06	1931919	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187574653 gb DS981529.1	94.74	19	1	0	5	23	987305	987323	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187574658 gb DS981524.1	100	16	0	0	3	18	3E+06	2913437	0.84	30.1
P3K4311bK0_(R)	gij187563620 gb DS984207.1	90	20	2	0	2	21	1092	1111	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187566785 gb DS983163.1	100	15	0	0	9	23	4367	4381	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187566940 gb DS983014.1	95	20	0	1	4	23	13661	13679	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570155 gb DS982027.1	94.44	18	1	0	5	22	3447	3464	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570250 gb DS981932.1	100	15	0	0	9	23	21953	21967	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570264 gb DS981918.1	94.44	18	1	0	5	22	90717	90700	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570419 gb DS981763.1	100	15	0	0	9	23	256739	256725	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570439 gb DS981743.1	100	15	0	0	8	22	248934	248948	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570439 gb DS981743.1	100	15	0	0	8	22	269439	269453	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187570492 gb DS981690.1	100	15	0	0	5	19	244115	244101	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187572545 gb DS981637.1	100	15	0	0	8	22	208773	208759	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187572563 gb DS981619.1	94.44	18	1	0	4	21	901366	901349	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187572581 gb DS981601.1	90	20	2	0	2	21	205258	205277	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187572588 gb DS981594.1	100	15	0	0	9	23	921376	921390	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187572599 gb DS981583.1	100	15	0	0	9	23	242688	242674	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187572600 gb DS981582.1	100	15	0	0	9	23	995912	995898	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187574644 gb DS981538.1	100	15	0	0	9	23	3E+06	2576396	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187574659 gb DS981523.1	100	15	0	0	9	23	213218	213232	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187574659 gb DS981523.1	100	15	0	0	7	21	4E+06	3586336	2.9	28.3
P3K4311bK0_(R)	gij187574661 gb DS981521.1	100	15	0	0	6	20	2E+06	2159462	2.9	28.3
# Query: CPM1573CC											
# Fields: query id	Subject id	% Identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 1 hits found											
CPM1573CC_(F)	gij187572570 gb DS981612.1	100	21	0	0	1	21	550425	550405	0.002	39.2
# 2 hits found											
CPM1573CC_(R)	gij187572570 gb DS981612.1	100	20	0	0	1	20	550322	550341	0.006	37.4
CPM1573CC_(R)	gij187574653 gb DS981529.1	100	16	0	0	1	16	429945	429930	0.84	30.1

Query: P3K6372CC

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 1 hits found											
P3K6372CC_(F)	gij187570478 gb DS981704.1	100	22	0	0	1	22	41618	41639	0.0005	41

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 1 hits found											
P3K6372CC_(R)	gij187574641 gb DS981541.1	94.44	18	1	0	4	21	277009	277026	2.9	28.3

Query: P6K969CC

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 1 hits found											
P6K969CC_(F)	gij187572616 gb DS981566.1	100	20	0	0	1	20	928953	928934	0.006	37.4

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 22 hits found											
P6K969CC_(R)	gij187572616 gb DS981566.1	100	23	0	0	1	23	928778	928800	0.0001	42.8
P6K969CC_(R)	gij187572616 gb DS981566.1	90	20	2	0	4	23	1E+06	1444902	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187564139 gb DS983688.1	95.45	22	1	0	1	22	4481	4502	0.02	35.6
P6K969CC_(R)	gij187572605 gb DS981577.1	100	16	0	0	8	23	533539	533554	0.84	30.1
P6K969CC_(R)	gij187563232 gb DS984595.1	90	20	2	0	4	23	1913	1894	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187567438 gb DS982627.1	94.44	18	1	0	4	21	5641	5658	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187569881 gb DS982279.1	100	15	0	0	9	23	27720	27706	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187570382 gb DS981800.1	100	15	0	0	9	23	3461	3447	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187570425 gb DS981757.1	100	15	0	0	9	23	216749	216735	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187570474 gb DS981708.1	100	15	0	0	4	18	344800	344786	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187570483 gb DS981699.1	90	20	2	0	4	23	289955	289974	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187570489 gb DS981693.1	100	15	0	0	1	15	3312	3326	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187572533 gb DS981649.1	100	15	0	0	8	22	752745	752759	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187572588 gb DS981594.1	94.44	18	1	0	6	23	354286	354303	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187572612 gb DS981570.1	90	20	2	0	4	23	1E+06	1E+06	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574638 gb DS981544.1	100	15	0	0	9	23	2E+06	2E+06	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574639 gb DS981543.1	94.44	18	1	0	6	23	2E+06	2E+06	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574652 gb DS981530.1	90	20	2	0	2	21	3E+06	3E+06	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574653 gb DS981529.1	90	20	2	0	4	23	2E+06	2E+06	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574657 gb DS981525.1	90	20	2	0	4	23	917976	917957	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574659 gb DS981523.1	94.44	18	1	0	6	23	3E+06	3E+06	2.9	28.3
P6K969CC_(R)	gij187574660 gb DS981522.1	100	15	0	0	2	16	2E+06	2E+06	2.9	28.3

Query: P3K1568A5

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 0 hits found											
P3K1568A5_(F)											

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 2 hits found											
P3K1568A5_(R)	gi 187566591 gb DS983357.1	100	15	0	0	3	17	9873	9859	2.9	28.3
P3K1568A5_(R)	gi 187567398 gb DS982658.1	100	15	0	0	4	18	15717	15703	2.9	28.3
# Query: P3K1426C0											
# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 8 hits found											
P3K1426C0_(F)	gi 187570448 gb DS981734.1	100	23	0	0	1	23	48374	48352	1E-04	42.8
P3K1426C0_(F)	gi 187572522 gb DS981660.1	100	16	0	0	6	21	230353	230338	0.84	30.1
P3K1426C0_(F)	gi 187570106 gb DS982076.1	94.44	18	1	0	4	21	14450	14467	2.9	28.3
P3K1426C0_(F)	gi 187571509 gb DS981673.1	94.44	18	1	0	1	18	158970	158987	2.9	28.3
P3K1426C0_(F)	gi 187572555 gb DS981627.1	90	20	2	0	1	20	587035	587016	2.9	28.3
P3K1426C0_(F)	gi 187572603 gb DS981579.1	100	15	0	0	7	21	1E+06	1094651	2.9	28.3
P3K1426C0_(F)	gi 187574631 gb DS981551.1	90	20	2	0	1	20	1E+06	1092674	2.9	28.3
P3K1426C0_(F)	gi 187574656 gb DS981526.1	94.44	18	1	0	5	22	2E+06	2353907	2.9	28.3
# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 4 hits found											
P3K1426C0_(R)	gi 187570448 gb DS981734.1	100	20	0	0	1	20	48271	48290	0.006	37.4
P3K1426C0_(R)	gi 187570052 gb DS982130.1	100	16	0	0	2	17	20692	20707	0.84	30.1
P3K1426C0_(R)	gi 187569853 gb DS982303.1	100	15	0	0	5	19	2992	3006	2.9	28.3
P3K1426C0_(R)	gi 187574656 gb DS981526.1	94.44	18	1	0	3	20	3E+06	2923124	2.9	28.3
# Query: P3K6947C0											
# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 48 hits found											
P3K6947C0_(F)	gi 187572570 gb DS981612.1	100	19	0	0	1	19	593620	593602	0.02	35.6
P3K6947C0_(F)	gi 187572570 gb DS981612.1	94.44	18	1	0	3	20	757400	757383	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gi 187572614 gb DS981568.1	100	19	0	0	2	20	19117	19099	0.02	35.6
P3K6947C0_(F)	gi 187574644 gb DS981538.1	100	19	0	0	2	20	775171	775189	0.02	35.6
P3K6947C0_(F)	gi 187566898 gb DS983050.1	100	18	0	0	3	20	9080	9063	0.069	33.7
P3K6947C0_(F)	gi 187572585 gb DS981597.1	100	18	0	0	3	20	939356	939373	0.069	33.7
P3K6947C0_(F)	gi 187574636 gb DS981546.1	100	18	0	0	2	19	539474	539457	0.069	33.7
P3K6947C0_(F)	gi 187574636 gb DS981546.1	94.44	18	1	0	3	20	1E+06	1433745	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gi 187574650 gb DS981532.1	100	18	0	0	3	20	1E+06	1185348	0.069	33.7
P3K6947C0_(F)	gi 187570072 gb DS982110.1	100	17	0	0	4	20	4654	4638	0.24	31.9
P3K6947C0_(F)	gi 187570072 gb DS982110.1	100	16	0	0	5	20	23590	23605	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gi 187570415 gb DS981767.1	100	17	0	0	4	20	212856	212840	0.24	31.9
P3K6947C0_(F)	gi 187570505 gb DS981677.1	100	17	0	0	4	20	439319	439335	0.24	31.9
P3K6947C0_(F)	gi 187572623 gb DS981559.1	95	20	1	0	1	20	2E+06	2187346	0.24	31.9
P3K6947C0_(F)	gi 187574653 gb DS981529.1	100	17	0	0	4	20	17811	17795	0.24	31.9
P3K6947C0_(F)	gi 187574653 gb DS981529.1	100	16	0	0	4	19	2E+06	1965687	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gi 187574653 gb DS981529.1	94.44	18	1	0	3	20	2E+06	2131887	2.9	28.3

P3K6947C0_(F)	gij187570467 gb DS981715.1	100	16	0	0	3	18	34970	34985	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gij187572516 gb DS981666.1	100	16	0	0	3	18	86416	86401	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gij187574628 gb DS981554.1	100	16	0	0	3	18	949817	949832	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gij187574646 gb DS981536.1	94.74	19	1	0	2	20	1E+06	1181683	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gij187574647 gb DS981535.1	94.74	19	1	0	2	20	2E+06	2319011	0.84	30.1
P3K6947C0_(F)	gij187563837 gb DS983990.1	95	20	0	1	2	20	5958	5977	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187563843 gb DS983984.1	94.44	18	1	0	2	19	5637	5620	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187566549 gb DS983399.1	94.44	18	1	0	3	20	3467	3484	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187566580 gb DS983368.1	94.44	18	1	0	3	20	2211	2228	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187567626 gb DS982484.1	100	15	0	0	4	18	7858	7844	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187567632 gb DS982478.1	94.44	18	1	0	3	20	12644	12627	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187567664 gb DS982452.1	94.44	18	1	0	3	20	12057	12040	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187570029 gb DS982153.1	95	20	0	1	2	20	6971	6990	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187570052 gb DS982130.1	94.44	18	1	0	3	20	5966	5949	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187570247 gb DS981935.1	94.44	18	1	0	3	20	13038	13021	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187570274 gb DS981908.1	94.44	18	1	0	3	20	43468	43451	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187570483 gb DS981699.1	94.44	18	1	0	2	19	325721	325738	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572523 gb DS981659.1	94.44	18	1	0	3	20	647193	647176	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572532 gb DS981650.1	90	20	2	0	1	20	960051	960032	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572538 gb DS981644.1	94.44	18	1	0	3	20	439660	439677	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572564 gb DS981618.1	94.44	18	1	0	3	20	689808	689825	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572582 gb DS981600.1	100	15	0	0	6	20	406623	406609	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572582 gb DS981600.1	94.44	18	1	0	3	20	925385	925368	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572603 gb DS981579.1	94.44	18	1	0	3	20	491700	491717	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572605 gb DS981577.1	100	15	0	0	4	18	614122	614108	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187572613 gb DS981569.1	94.44	18	1	0	3	20	711133	711116	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187574629 gb DS981553.1	94.44	18	1	0	3	20	975800	975817	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187574639 gb DS981543.1	94.44	18	1	0	3	20	2E+06	1857446	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187574652 gb DS981530.1	94.44	18	1	0	3	20	2E+06	2367474	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187574652 gb DS981530.1	94.44	18	1	0	3	20	3E+06	2795477	2.9	28.3
P3K6947C0_(F)	gij187574655 gb DS981527.1	100	15	0	0	4	18	2E+06	1501065	2.9	28.3
# Fields: query id											
Subject id % identity Alignment length Mismatches Gap opens Q. start Q. end S. start S. end Evalua Bit score											
# 3 hits found											
P3K6947C0_(R)	gij187572570 gb DS981612.1	95	20	1	0	1	20	593499	593518	0.24	31.9
P3K6947C0_(R)	gij187572529 gb DS981653.1	90	20	2	0	1	20	666706	666725	2.9	28.3
P3K6947C0_(R)	gij187574654 gb DS981528.1	100	15	0	0	4	18	2E+06	2047427	2.9	28.3
# Query: ctg-268CC											
Subject id % identity Alignment length Mismatches Gap opens Q. start Q. end S. start S. end Evalua Bit score											
# 13 hits found											
ctg-268CC_(F)	gij187574657 gb DS981525.1	100	22	0	0	1	22	1E+06	1248443	0.0005	41
ctg-268CC_(F)	gij187566960 gb DS983000.1	100	17	0	0	6	22	177	161	0.24	31.9
ctg-268CC_(F)	gij187572620 gb DS981562.1	100	16	0	0	3	18	2E+06	1681287	0.84	30.1

ctg-268CC_(F)	gij187570014 gb DS982168.1	90	20	2	0	1	20	18952	18933	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187570050 gb DS982132.1	100	15	0	0	7	21	11364	11378	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187570456 gb DS981726.1	94.44	18	1	0	1	18	471467	471484	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187570475 gb DS981707.1	100	15	0	0	8	22	242919	242933	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187572624 gb DS981558.1	94.44	18	1	0	1	18	558733	558716	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187574638 gb DS981544.1	94.44	18	1	0	1	18	2E+06	1669041	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187574651 gb DS981531.1	100	15	0	0	8	22	3E+06	2728861	2.9	28.3
ctg-268CC_(F)	gij187574662 gb DS981520.1	94.44	18	1	0	1	18	2E+06	1657381	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 3 hits found											
ctg-268CC_(R)	gij187574657 gb DS981525.1	100	20	0	0	1	20	1E+06	1246319	0.006	37.4
ctg-268CC_(R)	gij187568719 gb DS982412.1	94.44	18	1	0	2	19	16383	16400	2.9	28.3
ctg-268CC_(R)	gij187572577 gb DS981605.1	100	15	0	0	4	18	325235	325221	2.9	28.3

Query: CPM1550C0

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 14 hits found											
CPM1550C0_(F)	gij187567534 gb DS982555.1	100	23	0	0	1	23	21122	21100	0.0001	42.8
CPM1550C0_(F)	gij187572609 gb DS981573.1	90.91	22	2	0	2	23	671237	671258	0.24	31.9
CPM1550C0_(F)	gij187572611 gb DS981571.1	91.67	24	0	1	2	23	553375	553352	0.24	31.9
CPM1550C0_(F)	gij187574640 gb DS981542.1	90.48	21	2	0	2	22	1E+06	1411240	0.84	30.1
CPM1550C0_(F)	gij187574645 gb DS981537.1	100	16	0	0	8	23	1E+06	1429954	0.84	30.1
CPM1550C0_(F)	gij187569987 gb DS982195.1	100	15	0	0	9	23	3199	3213	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187572523 gb DS981659.1	100	15	0	0	9	23	28751	28765	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187572534 gb DS981648.1	100	15	0	0	4	18	782219	782233	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187572539 gb DS981643.1	100	15	0	0	4	18	444892	444878	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187572595 gb DS981587.1	100	15	0	0	9	23	86843	86857	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187572615 gb DS981567.1	94.44	18	1	0	5	22	218291	218274	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187572624 gb DS981558.1	100	15	0	0	9	23	1E+06	1415736	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187574649 gb DS981533.1	100	15	0	0	6	20	1E+06	1449400	2.9	28.3
CPM1550C0_(F)	gij187574661 gb DS981521.1	100	15	0	0	9	23	2E+06	2190412	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 4 hits found											
CPM1550C0_(R)	gij187567534 gb DS982555.1	100	21	0	0	1	21	20944	20964	0.002	39.2
CPM1550C0_(R)	gij187572528 gb DS981654.1	94.44	18	1	0	2	19	489438	489455	2.9	28.3
CPM1550C0_(R)	gij187572532 gb DS981650.1	100	15	0	0	2	16	195642	195656	2.9	28.3
CPM1550C0_(R)	gij187574647 gb DS981535.1	94.44	18	1	0	2	19	2E+06	2039395	2.9	28.3

Query: CPM976aK0

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 4 hits found											
CPM976aK0_(F)	gij187574652 gb DS981530.1	100	21	0	0	1	21	3E+06	3013394	0.002	39.2
CPM976aK0_(F)	gij187574661 gb DS981521.1	100	16	0	0	3	18	5E+06	4815659	0.84	30.1
CPM976aK0_(F)	gij187570470 gb DS981712.1	100	15	0	0	3	17	280916	280930	2.9	28.3
CPM976aK0_(F)	gij187572602 gb DS981580.1	100	15	0	0	4	18	904802	904816	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 3 hits found											
CPM976aK0_(R)	gij187574652 gb DS981530.1	100	20	0	0	1	20	3E+06	3013294	0.006	37.4
CPM976aK0_(R)	gij187572583 gb DS981599.1	100	16	0	0	5	20	537308	537323	0.84	30.1
CPM976aK0_(R)	gij187574661 gb DS981521.1	100	15	0	0	2	16	2E+06	2385026	2.9	28.3

Query: P6K268CC

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 3 hits found											
P6K268CC_(F)	gij187570393 gb DS981789.1	100	20	0	0	1	20	37333	37314	0.006	37.4
P6K268CC_(F)	gij187572530 gb DS981652.1	100	16	0	0	5	20	586958	586943	0.84	30.1
P6K268CC_(F)	gij187570472 gb DS981710.1	90	20	2	0	1	20	165777	165758	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 5 hits found											
P6K268CC_(R)	gij187570393 gb DS981789.1	95.45	22	0	1	1	22	37159	37179	0.24	31.9
P6K268CC_(R)	gij187572523 gb DS981659.1	94.44	18	1	0	5	22	118871	118854	2.9	28.3
P6K268CC_(R)	gij187572549 gb DS981633.1	100	15	0	0	2	16	622072	622058	2.9	28.3
P6K268CC_(R)	gij187572564 gb DS981618.1	100	15	0	0	2	16	251323	251309	2.9	28.3
P6K268CC_(R)	gij187574652 gb DS981530.1	94.44	18	1	0	4	21	2E+06	1906630	2.9	28.3

Query: ctg-733A5

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 8 hits found											
ctg-733A5_(F)	gij187574635 gb DS981547.1	100	24	0	0	1	24	1E+06	1172262	0.00004	44.6
ctg-733A5_(F)	gij187569980 gb DS982202.1	95	20	1	0	5	24	851	870	0.24	31.9
ctg-733A5_(F)	gij187572600 gb DS981582.1	100	17	0	0	4	20	955448	955432	0.24	31.9
ctg-733A5_(F)	gij187572587 gb DS981595.1	100	16	0	0	9	24	1E+06	1092656	0.84	30.1
ctg-733A5_(F)	gij187572587 gb DS981595.1	100	16	0	0	9	24	1E+06	1271449	0.84	30.1
ctg-733A5_(F)	gij187566686 gb DS983262.1	94.44	18	1	0	3	20	7987	7970	2.9	28.3
ctg-733A5_(F)	gij187572548 gb DS981634.1	100	15	0	0	3	17	648017	648031	2.9	28.3
ctg-733A5_(F)	gij187572561 gb DS981621.1	94.44	18	1	0	3	20	370036	370019	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 16 hits found											
ctg-733A5_(R)	gij187574635 gb DS981547.1	100	23	0	0	1	23	1E+06	1172377	0.0001	42.8
ctg-733A5_(R)	gij187570501 gb DS981681.1	95	20	1	0	2	21	458186	458205	0.24	31.9

ctg-733A5_(R)	gi 187572552 gb DS981630.1	95	20	1	0	1	20	362288	362269	0.24	31.9
ctg-733A5_(R)	gi 187572552 gb DS981630.1	95	20	1	0	1	20	395021	395002	0.24	31.9
ctg-733A5_(R)	gi 187567647 gb DS982466.1	90	20	2	0	4	23	14781	14800	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187570494 gb DS981688.1	90	20	2	0	1	20	420431	420412	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187572518 gb DS981664.1	100	15	0	0	4	18	390089	390103	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187572589 gb DS981593.1	90	20	2	0	1	20	89544	89525	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187572601 gb DS981581.1	94.44	18	1	0	5	22	150389	150372	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574629 gb DS981553.1	100	15	0	0	5	19	322243	322257	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574640 gb DS981542.1	90	20	2	0	4	23	917680	917661	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574644 gb DS981538.1	90	20	2	0	1	20	32198	32217	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574647 gb DS981535.1	100	15	0	0	9	23	623109	623123	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574653 gb DS981529.1	100	15	0	0	1	15	360461	360475	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574653 gb DS981529.1	94.44	18	1	0	3	20	1E+06	1207218	2.9	28.3
ctg-733A5_(R)	gi 187574655 gb DS981527.1	100	15	0	0	7	21	654557	654571	2.9	28.3

Query: P3K187C0

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 5 hits found											
P3K187C0_(F)	gi 187572515 gb DS981667.1	100	15	0	0	5	19	211645	211659	2.9	28.3
P3K187C0_(F)	gi 187572529 gb DS981653.1	100	15	0	0	3	17	715629	715643	2.9	28.3
P3K187C0_(F)	gi 187574628 gb DS981554.1	94.44	18	1	0	1	18	1E+06	1497894	2.9	28.3
P3K187C0_(F)	gi 187574643 gb DS981539.1	100	15	0	0	3	17	1E+06	1168567	2.9	28.3
P3K187C0_(F)	gi 187574658 gb DS981524.1	94.44	18	1	0	1	18	1E+06	1136668	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Evalue	Bit score
# 15 hits found											
P3K187C0_(R)	gi 187570468 gb DS981714.1	100	17	0	0	4	20	1E+06	1094111	0.24	31.9
P3K187C0_(R)	gi 187574641 gb DS981541.1	100	17	0	0	4	20	1E+06	1255239	0.24	31.9
P3K187C0_(R)	gi 187567242 gb DS982778.1	100	16	0	0	7	22	9010	8995	0.84	30.1
P3K187C0_(R)	gi 187572550 gb DS981632.1	100	16	0	0	1	16	614671	614686	0.84	30.1
P3K187C0_(R)	gi 187574655 gb DS981527.1	94.74	19	1	0	1	19	824206	824224	0.84	30.1
P3K187C0_(R)	gi 187574655 gb DS981527.1	90	20	2	0	3	22	2E+06	1576123	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187569976 gb DS982206.1	90	20	2	0	3	22	15941	15922	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187569980 gb DS982202.1	100	15	0	0	3	17	20300	20286	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187572573 gb DS981609.1	100	15	0	0	2	16	590266	590280	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187574630 gb DS981552.1	100	15	0	0	8	22	504292	504278	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187574639 gb DS981543.1	100	15	0	0	8	22	962723	962737	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187574643 gb DS981539.1	100	15	0	0	8	22	7795	7809	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187574648 gb DS981534.1	90	20	2	0	3	22	2E+06	2394833	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187574650 gb DS981532.1	90	20	2	0	3	22	875177	875196	2.9	28.3
P3K187C0_(R)	gi 187574658 gb DS981524.1	100	15	0	0	8	22	2E+06	2409642	2.9	28.3

Query: P3K2426aK3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Value	Bit score
# 5 hits found											
P3K2426aK3_(F)	gi 187570212 gb DS981970.1	100	20	0	0	1	20	31292	31273	0.006	37.4
P3K2426aK3_(F)	gi 187567199 gb DS982812.1	100	15	0	0	2	16	2070	2084	2.9	28.3
P3K2426aK3_(F)	gi 187570305 gb DS981877.1	100	15	0	0	1	15	33818	33832	2.9	28.3
P3K2426aK3_(F)	gi 187574651 gb DS981531.1	100	15	0	0	3	17	470410	470424	2.9	28.3
P3K2426aK3_(F)	gi 187574653 gb DS981529.1	100	15	0	0	3	17	2E+06	1536555	2.9	28.3

# Fields: query id	Subject id	% identity	Alignment length	Mismatches	Gap opens	Q. start	Q. end	S. start	S. end	Value	Bit score
# 19 hits found											
P3K2426aK3_(R)	gi 187570212 gb DS981970.1	100	22	0	0	1	22	31139	31160	0.0005	41
P3K2426aK3_(R)	gi 187566498 gb DS983444.1	95.45	22	1	0	1	22	2119	2098	0.02	35.6
P3K2426aK3_(R)	gi 187572610 gb DS981572.1	100	17	0	0	4	20	1E+06	1118984	0.24	31.9
P3K2426aK3_(R)	gi 187574631 gb DS981551.1	90.91	22	2	0	1	22	466620	466599	0.24	31.9
P3K2426aK3_(R)	gi 187567475 gb DS982599.1	100	15	0	0	7	21	4925	4939	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187570095 gb DS982087.1	100	15	0	0	1	15	9769	9755	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187570299 gb DS981883.1	100	15	0	0	8	22	38702	38688	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187570456 gb DS981726.1	100	15	0	0	6	20	479290	479276	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187570501 gb DS981681.1	100	15	0	0	8	22	278307	278293	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187572564 gb DS981618.1	100	15	0	0	5	19	877516	877502	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187572586 gb DS981596.1	100	15	0	0	4	18	199861	199847	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187572590 gb DS981592.1	100	15	0	0	6	20	1E+06	1244589	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187572591 gb DS981591.1	94.44	18	1	0	3	20	710745	710728	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187572626 gb DS981556.1	100	15	0	0	7	21	1E+06	1147907	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187574633 gb DS981549.1	90	20	2	0	1	20	2E+06	1727734	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187574643 gb DS981539.1	94.44	18	1	0	3	20	282709	282726	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187574649 gb DS981533.1	94.44	18	1	0	1	18	1E+06	1390558	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187574654 gb DS981528.1	100	15	0	0	8	22	2E+06	2008720	2.9	28.3
P3K2426aK3_(R)	gi 187574661 gb DS981521.1	94.44	18	1	0	3	20	4E+06	3627908	2.9	28.3

Anexo II Cuadro 4.1 Nombres descriptivos de 32 caracteres morfológicos evaluados y propuestos por UPOV (2010).

Variable	Abreviatura	Variable	Abreviatura	Variable	Abreviatura	Variable	Abreviatura
Planta		Fruto		Aspectos físico-químicos			
Altura de planta (cm)	AP	Peso de fruto	PF	pH	pH	Componente de color <i>L</i>	L-C
Altura del primer fruto (cm)	APF	Longitud de fruto (cm)	LF	Acidez	AT	Componente de color <i>a</i>	a-C
Diámetro de tallo (cm)	DT	Diámetro de fruto (cm)	DF	Sólidos solubles totales	°BRIX	Componente de color <i>b</i>	b-C
Longitud de peciolo (cm)	LP	Grosor de pulpa (cm)	GP	Licopenos en cáscara	Li-C	Componente de color <i>C</i>	C-C
Longitud de hoja (cm)	LH	Proporción longitud:diámetro de fruto	L:D-F	β-caroteno en cáscara	βC-C	Componente de color <i>h</i>	h-C
Ancho de hoja (cm)	AH			Licopenos en fruto	Li-P	Componente de color <i>L</i>	L-P
Proporción longitud:ancho de hoja	L:A-H			β-caroteno en fruto	β-caroteno en fruto	βC-P	a-P
Número de flores por nudo	NFL					Componente de color <i>b</i>	b-P
Número de frutos por nudo	NFN					Componente de color <i>C</i>	C-P
Número de frutos por planta	NFP					Componente de color <i>h</i>	h-P

Anexo III Cuadro 4.2. Mezcla de reacción de la digestión del ADN.

Componente	Volumen/Muestra
ADN 100 ng.µL ⁻¹	3.0 µL
10X buffer (Mse I) No. 4 (1X)	2.0 µL
10 mg BSA 0.1 mg.µL	0.2 µL
200 µL Eco R1 (4U)	0.2 µL
100 µL Mse I(1U)	0.1 µL
Agua ultrapura	14.5 µL
Volumen total	20 µL

Anexo IV Cuadro 4.3. Mezcla de reacción de la digestión/ligación

Componente	Volumen/Muestra
ADN digerido ¹	20 µL
5X buffer	6.0 µL
50 pmol Adap_Mse I	0.5 µL
5 pmolAdp_Eco R1	0.5 µL
T4 ligasa	1.0 µL
Agua ultrapura	2.0 µL
Volumen total	30 µL

Anexo V Cuadro 4.4. Mezcla de reacción para la preamplificación de la digestión/ligación

Componente	Volumen/Muestra
ADN digestión/ligación (diluido 1:5) ¹	5.0 µL
10X buffer de PCR	2.0 µL
50 mM MgCl ₂	0.6 µL
10mM dNTPs	0.4 µL
20 pMol primer EcoR1	1.0 µL
20 pMol primer Mse I	1.0 µL
Taq polimerasa	0.1 µL
Agua ultrapura	9.9 µL
Volumen total	20 µL

Anexo VI Cuadro 4.5. Procedimiento del programa de preamplificación utilizado.

Programa	Tiempo	Temperatura (°C)
Pre-desnaturalización	5'	94
20 ciclos	30"	94
	60"	56
	60"	72
	7'	72

Anexo VII Cuadro 4.6. Mezcla de reacción para amplificación selectiva.

Componente	Volumen/Muestra	Combinaciones			
Preamplificado (diluido 1:10 o 1:5) ¹	5.0 µL				
10X buffer de PCR	1.0 µL				
50 mM MgCl ₂	0.3 µL				
10mM dNTPs	0.2 µL				
primer EcoR1	2.25 µL	ACA	ACC	ACT	ACT
primer Mse I	1.0 µL	CTA	CTA	CTT	CGA
Taq polimerasa 5U/µL	0.1 µL				
Agua ultrapura	0.15 µL				
Volumen total	10 µL				

NOTA: solo los iniciadores Eco R1 son maracados con los flouoroforos (verde).

Anexo VIII Cuadro 4.7. Procedimiento del programa de amplificación selectiva 'toch down'.

Programa	Tiempo	Temperatura (°C)
Pre-desnaturalización	2'	94
13 ciclos 'touch down'	30"	94
	30"	65-56 (disminuyendo 0.7°C/ciclo)
	2'	72
	30 ciclos	30"
	30"	56
	2'	72
	7'	72

Anexo IX Cuadro 4.8. Mezcla de reacción para el marcador de peso molecular

Componente	Volumen/Muestra
SLS "formamida"	25.0 μ L
STD 400	0.25 μ L

