

---

2001 B - 2006 A

B01007726

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE PAPAYA

TRABAJO DE TITULACIÓN EN MODALIDAD DE:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CRISTÓBAL CAMARENA BERNARD

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Octubre de 2007

---



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**  
*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología*

1222/ C. C.BIOLOGÍA

C. Cristóbal Camarena Bernard

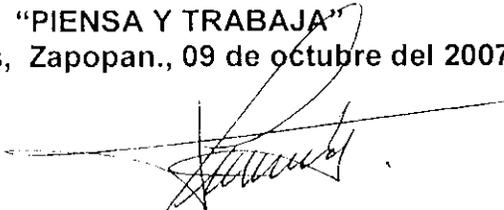
**PRESENTE**

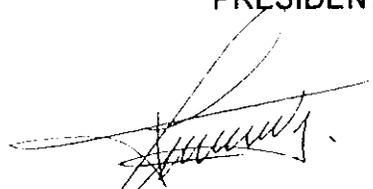
Manifetamos a ustedes que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes Opción Tesis**: con el titulo: **“Caracterización molecular de híbridos de papaya”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **Dra. Antonia Gutiérrez Mora** y como asesor a el/la **M.C. Ernesto Tapia Campos**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“PIENSA Y TRABAJA”**  
Las Agujas, Zapopan., 09 de octubre del 2007.

  
**DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

  
**M en C. GLORIA PARADA BARRERA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



FORMAT

Dr. Fco. Martin Huerta Martinez  
Presidente del Comité de Titulación  
Licenciatura en Biología  
CUCBA  
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título "Caracterización molecular de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.)" que realizó el/la pasante Cristóbal Camarena Bernard con número de código B01007726 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo

Atentamente  
Lugar y fecha

4 de Octubre de 2007  
Zapopan, Jalisco.

*Vo Bo*  
*[Signature]*  
05/10/07

Firma *Antonia G. M.*  
Nombre *Antonia Gutierrez Mora*  
Director/a del trabajo

*[Signature]*  
Firma *[Signature]*  
Nombre *Emilio Tepez Compa*  
Asesor(es)

Nombre completo de los Síndicos designados por el Comité de Titulación	Firma designada	Fecha de revisión
<i>Liberato Porbillo Martinez</i>	<i>[Signature]</i>	<i>04.09.2007</i>
<i>Aline Sandoval</i>	<i>[Signature]</i>	<i>04.09.2007</i>
<i>Aaron Rodriguez Contreras</i>	<i>[Signature]</i>	<i>04/10/2007</i>
<i>Supl. <i>[Signature]</i></i>	<i>[Signature]</i>	<i>04.09.2007</i>
<i>Nombre <i>[Signature]</i></i>	<i>[Signature]</i>	

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.  
Presidente del Comité de Titulación.  
Licenciatura en Biología.  
CUCBA.  
Presente

Esperando que se encuentre en las mejores condiciones, deseo pedir el permiso para imprimir mi tesis en tamaño carta ya que la misma contiene imágenes que tienen detalles que sólo se pueden apreciar en tamaño carta, razón por la cual deseo que se analice mi caso y si es posible se me permita imprimirla así.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo y quedo de usted como S. s.

Atentamente



Cristóbal Camarena Bernard  
Código B01007726

Las Agujas, Zapopan., 4 de Octubre de 2007

Vo B.  
~~Camarena~~  
04/oct/07



Este trabajo fue realizado en la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ, A.C. dentro del proyecto: "Evaluación de plantas tolerantes al virus de la mancha anular de la papaya obtenidas a través de mejoramiento genético por cruza y retrocruza con plantas silvestres tolerantes al virus y la variedad maradol". Clave SAGARPA-2004-C01-038.



## Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1 Características generales de la papaya	3
2.2 Virus de la mancha anular de la papaya	4
2.3 Hibridación interespecífica	6
2.4 Marcadores moleculares	9
3. Problemática	15
4. Justificación	16
5. Objetivos	17
6. Hipótesis	17
7. Materiales y métodos	
7.1 Material vegetal	18
7.2 Extracción de ADN	19
7.3 Estimación de la concentración de las muestras	19
7.4 RAPD	
7.4.1 Iniciadores	20
7.4.2 Mezcla de reacción para RAPD	21
7.4.3 Amplificación y condiciones de la PCR	21
7.4.4 Electroforesis	22
7.4.5 Análisis de datos	23



8. Resultados y discusión	
8.1 Extracción de ADN y estimación de la concentración de las muestras	24
8.2 Niveles de polimorfismo	26
8.3 Análisis de similaridad	31
8.4 Dendrograma	33
8.5 Análisis de coordenadas principales	36
9. Conclusiones	38
10. Bibliografía	39
11. Anexos	46



## Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. <i>Carica papaya</i> var. maradol	3
Figura 2. Especie silvestre de <i>Carica sp.</i>	7
Figura 3. Diagrama para la obtención de híbridos	9
Figura 4. Gel de calidad	26
Figura 5. Ejemplo de patrón de bandas obtenido con el iniciador 6	26
Figura 6. Dendrograma	33
Figura 7. Análisis de coordenadas principales	36
Tabla 1. Relación de ejemplares colectados para el análisis RAPD	18
Tabla 2. Secuencias de los iniciadores utilizados	21
Tabla 3. Temperaturas y tiempo de la reacción de PCR	22
Tabla 4. Índices de absorbancia	25
Tabla 5. Número de bandas y polimorfismo por iniciador	28
Tabla 6. Nivel de polimorfismo por grupos estudiados	28
Tabla 7. Bandas compartidas por las retrocruzas y los parentales	30



## 1. Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) pertenece a la familia Caricaceae, donde los géneros *Carica*, *Jacaratia* y *Jarilla* son exclusivamente americanos, mientras que *Cylicomorpha* es originaria de África. Dentro del género *Carica* hay aproximadamente 22 especies pero sólo *C. papaya* es cultivada a gran escala debido a su fruto comestible (Lötschert y Beese, 1983).

El cultivo de papaya es actualmente uno de los principales cultivos en los trópicos de todo el mundo y su fruto es importado principalmente por Estados Unidos y países de Europa. Además, es fuente de enzimas utilizadas en la industria farmacéutica y alimenticia. La producción mundial de papaya es de aproximadamente 6.7 millones de ton al año y en México se cultivaron, en el 2006, alrededor de 19 000 ha con una producción de 805,672 ton (FAO, 2006).

Se han desarrollado muchas variedades de *Carica papaya*, pero la que más se consume a nivel mundial es la maradol, sin embargo, es la más susceptible al Virus de la Mancha Anular de la Papaya (VMAP o PRSV por sus siglas en inglés). La enfermedad causada por el VMAP es la principal causa de pérdida de este cultivo y se encuentra en todas las áreas donde se cultiva la papaya. Se transmite por injerto y por áfidos pero nunca por semilla. Un método para combatir esta enfermedad es la hibridación interespecífica que se lleva a cabo cruzando variedades comerciales de *C. papaya* con especies silvestres de *Carica* que muestran resistencia al virus (Lötschert y Beese, 1983).



*Carica cauliflora* es una especie silvestre que ha demostrado ser resistente al VMAP y ha sido ampliamente usada para la hibridación con papayas comerciales, pero la cruce de *Carica papaya* x *C. cauliflora* deriva en barreras postcigóticas que impiden la obtención de plantas adultas. Para superar esto se ha recurrido al rescate de embriones (Magdalita y col., 1998; Gutiérrez-Mora, 2002).

El análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés) es una herramienta confiable y estable para detectar hibridación. Esta técnica utiliza iniciadores con secuencias arbitrarias de nucleótidos, que cuando amplifica regiones al azar, muestran los polimorfismos que hay entre especies y/o variedades.

En este trabajo se analizó por medio RAPDs el ADN de 15 híbridos  $R_2$  y se comparó con el de sus progenitores para detectar polimorfismos y poder comprobar la hibridación. Además se incluyeron individuos  $F_2$ , una especie de papaya silvestre proveniente de Yucatán y una variedad hawaiana de papaya, éstos últimos como referencia.



## 2. Antecedentes

### 2.1. Características generales de la papaya

La situación taxonómica del género *Carica* está actualmente en discusión, pues Badillo (1993) lo divide en dos, *Carica* y *Vasconcella*, dejando a *Carica papaya* como única especie del género; sin embargo, esto no ha sido ampliamente aceptado (Magdalita y col., 1997a; Magdalita y col., 1997b; Magdalita y col., 1998; Mallikarjuna y col., 1999; Van Droogenbroeck y col., 2002; Van Droogenbroeck y col., 2006).

La papaya es originaria de los trópicos de América, se distribuye desde el sur de México hasta Brasil y se cultiva desde antes de la llegada de los españoles (Lötschert y Beese, 1983). Gracias a la eficiente propagación por semilla, esta planta fue fácilmente distribuida y popularizada por los colonizadores españoles en todas las regiones tropicales del mundo (Ibar, 1979).



Figura 1. *Carica papaya* var. maradol.



La papaya es una de las principales especies cultivadas en los trópicos de todo el mundo y se han desarrollado muchas variedades de esta especie. La variedad que más se consume a nivel mundial es la maradol (figura 1), desarrollada por el fruticultor cubano Adolfo Rodríguez Rivero. La altura de esta planta es de aprox. 2.5 m, lo cual la sitúa como enana al compararse con otras variedades y con especies silvestres. Presenta fructificación temprana, pulpa de color rosado, de consistencia firme y sabor dulce. Estas características hacen que sea una variedad de interés para el productor y que tenga preferencia por el consumidor en el ámbito internacional. Además, la papaya es importante fuente de sustancias bioquímicas, como carpaína, usada en la industria farmacéutica (Chan y Tang, 1979), y papaína y quimopapaína, enzimas proteolíticas (Medora y col., 1973; Hossain y col., 1993).

Según la FAO (2006), México es el segundo productor de papaya en el mundo con casi un millón de toneladas al año y es el principal exportador a Estados Unidos. El estado de Jalisco ocupa el lugar número 9 en la producción de papaya en el país, por debajo de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Colima, Yucatán, Guerrero, Michoacán y Tabasco (SAGARPA, 2006).

## **2.2 Virus de la mancha anular de la papaya**

La variedad maradol es la más cultivada a nivel mundial por las características ya mencionadas, pero es también la más perjudicada por el VMAP. Las plantas infectadas con este virus desarrollan primeramente una clorosis en las hojas jóvenes, seguida por el aclaramiento de las nervaduras,



encrespamiento y moteado evidente de las hojas. Éstas se deforman, se reducen y se vuelven filiformes. En el tallo y los pecíolos se forman manchas grasosas de color verde oscuro, alargadas, en los frutos las manchas son en forma de anillo. Las flores son también atacadas, formándose en los pétalos manchas anilladas, similares a las de los frutos. Muchas flores y hojas llegan a caerse y los frutos se reducen en tamaño y se deforman (Conover, 1964; Cook, 1972; Gonsalves, 1998).

Se han realizado muchos intentos para controlar efectivamente el VMAP. El uso de aceite vegetal y/o insecticidas sistémicos asperjados a las plantas para matar los insectos vectores de la enfermedad, controla la enfermedad únicamente cuando el porcentaje de inóculo dentro de la plantación es bajo y cuando las aspersiones son periódicas. En Taiwán, la enfermedad se evita sembrando en las estaciones donde ocurren pocos áfidos. Se han intercalado cultivos de tallo alto como barreras, por ejemplo la caña de azúcar y el maíz. Se colocan plásticos reflectores de color plateado después del transplante en el campo y las plántulas se protegen en el vivero con bolsas plásticas transparentes o mallas antiáfidos. La erradicación de las plantas enfermas sólo es eficiente donde el virus no es endémico, por lo que el virus permanece latente (Yeh y col., 1988).

Otra solución son las plantas resistentes obtenidas mediante ingeniería genética. Fitch y col. (1993) reportaron alta eficiencia en la transferencia del gen que codifica para la cápside del virus, por medio de biobalística, misma



que le confiere una protección cruzada que impide que el virus se desarrolle dentro de la planta. Estos investigadores utilizaron embriones cigóticos inmaduros los cuales se bombardearon con un plásmido construido con el gen que codifica para la proteína de la cápside y dos genes marcadores, Neomicina Fosfotransferasa (NPTII) y *B*-glucuronidasa (GUS). Esto no ha sido del todo exitoso debido a que el virus puede sufrir mutaciones.

Cabrera-Ponce y col. (1995) desarrollaron plantas transgénicas de papaya resistentes a herbicidas modificando el ADN mediante bombardeo de partículas.

Por otro lado, México es país de origen de la papaya por lo que utilizar plantas transgénicas implicaría una gran pérdida en la diversidad biológica, además del rechazo total a los productos transgénicos por parte de los países con mayor consumo de este fruto (Milligan, 1994; Jauhar, 2006).

### **2.3 Hibridación interespecífica**

Debido a todas estas limitaciones ya mencionadas se ha recurrido al desarrollo de cultivares genéticamente resistentes por medio de la hibridación interespecífica e intervarietal, que es ampliamente usada para la transferencia de genes de individuos silvestres resistentes a plagas y enfermedades a cultivares económicamente importantes (Jauhar, 2006).

Específicamente con papaya se han llevado a cabo cruces entre *C. papaya* y especies silvestres que muestran resistencia genética al VMAP (figura 2) (Alvizo-Villasana y col., 1987; Gutiérrez-Mora, 2002; Magdalita y col.,



1997a; Magdalita, y col., 1997b; Magdalita y col., 1998; Manshardt y Wenslaff, 1989a; Manshardt y Wenslaff, 1989b).



Figura 2. Especie silvestre de *Carica* sp.

*Carica cauliflora* es una especie silvestre que no es de importancia económica, pues sus frutos no son comestibles, pero ha demostrado ser resistente al VMAP por lo que se ha usado para obtener híbridos resistentes. Sin embargo, las cruces con *C. papaya* no proporcionan buenos resultados dadas las barreras de incompatibilidad genética que ocasionan aborto de embriones inmaduros (Magdalita y col., 1998;

Gutiérrez-Mora, 2002).

Estas barreras postcigóticas que se derivan de la cruce de estas dos especies han sido superadas gracias a la técnica de rescate de embriones, en la cual se extraen los embriones inmaduros y se mantienen en un medio de cultivo adecuado para su desarrollo (Manshardt y Wenslaff, 1989a; Gutiérrez-Mora, 2002).



Para obtener un híbrido que sea resistente al virus, pero que además tenga las características comerciales de la variedad maradol, se han llevado a cabo retrocruzas hacia maradol (Gutiérrez-Mora, 2002). Para esto, el procedimiento comienza llevando a cabo cruzas entre *Carica papaya* var. maradol con *Carica* sp. silvestre resistente al VMAP. De la primera generación ( $F_1$ ) se seleccionan las que muestran mayor resistencia al virus y se realiza una retrocruza ( $R_1$ ) hacia maradol. Se seleccionan plantas de la generación  $R_1$  resistentes al virus pero además con las características comerciales de maradol, como tamaño, sabor, color y olor del fruto, y se realiza una segunda retrocruza ( $R_2$ ) hacia maradol, donde teóricamente cada planta deberán tener una carga genética del 87.5 % de maradol y un 12.5 % con las papayas silvestres (Figura 3).

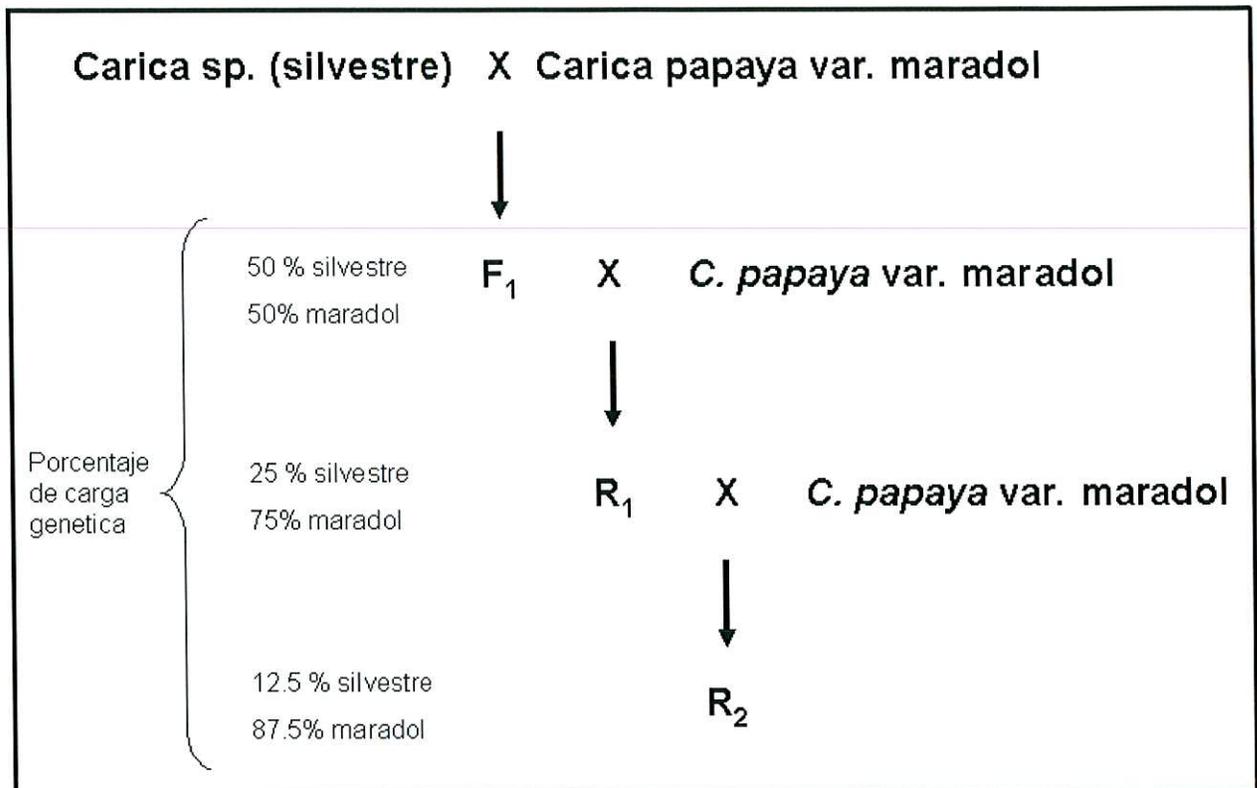


Figura 3. Diagrama para la obtención de híbridos tolerantes a través de la cruz de *Carica papaya* X *Carica sp.* silvestre.

#### 2.4 Marcadores moleculares

Los marcadores son caracteres que diferencian a un organismo de otro y tienen gran importancia en estudios evolutivos y de variabilidad, usándose principalmente en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos y mejoras genéticas (Rico-Cabanas, 2005).

Existen tres tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos y moleculares. Tradicionalmente, la caracterización y determinación taxonómica de especies o variedades se basa en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Azofeifa-Delgado, 2006). Sin embargo, la expresión de estos caracteres puede estar influenciada por condiciones del medio ambiente,



estación del año, segregación genética y estado de desarrollo de la planta (Beckman y Soller, 1986). Además, bajos niveles de polimorfismo limitan la confiabilidad de los resultados del análisis y es particularmente difícil diferenciar especies o variedades estrechamente relacionadas (Greef y Triest, 1999).

Por otro lado, los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de métodos de identificación basados en marcadores moleculares que superan casi todas las limitantes de los morfológicos, principalmente las influencias del medio ambiente. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis y permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés (Azofeifa-Delgado, 2006; Rico-Cabanias, 2005).

Los marcadores más usados son los análisis de patrones de isoenzimas, microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR), Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP por sus siglas en inglés), Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés), Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en inglés), etc. (Azofeifa-Delgado, 2006; Rico-Cabanias, 2005; Ude, 2002).

Las isoenzimas fueron los primeros marcadores bioquímicos en ser usados por su metodología rápida y sencilla, sin embargo, al igual que en el caso de los marcadores morfológicos, los resultados pueden ser afectados por



cambios en el ambiente y la etapa de desarrollo de las plantas (Rico-Cabanas, 2005). Tanksley (1993) menciona que el uso de las isoenzimas ha estado muy limitado por el escaso número de colorantes enzimáticos disponibles y por la imposibilidad de contar con suficientes marcadores para cubrir todo un genoma.

Con el descubrimiento de la reacción de polimerización en cadena (PCR), una gran cantidad de técnicas de marcadores moleculares se han generado (Jauhar, 2006), y hasta el momento se siguen generando más, con diferentes ventajas y desventajas, de tal manera que muchas veces se convierte en un problema determinar cual seria la técnica más conveniente para lograr el objetivo planeado.

La técnica RFLP fue la primera técnica desarrollada basada en marcadores de ADN en el 1970. Se define como la variación en la longitud de los fragmentos de ADN producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de ADNs genómicos de dos o más individuos de una especie. Su principal inconveniente es el elevado costo económico (Azofeifa-Delgado, 2006; Rico-Cabanas, 2005).

En los años 90s se desarrollaron en plantas métodos para detectar variabilidad basados en microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats). Se trata de secuencias de 2-6 pb repetidas en tandem, en un número que va de dos hasta cientos de veces, y que se presentan distribuidos aleatoriamente en el genoma de los eucariotas. Estos marcadores proporcionan un nivel de polimorfismo elevado que se produce por el cambio en el número de repeticiones. La mayoría se comportan como codominantes. Son útiles en la



construcción de mapas genéticos y altamente informativos. El desarrollo de marcadores SSR es laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite) (Azofeifa-Delgado, 2006; Rico-Cabanias, 2005).

Los AFLPs son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles. Esta técnica combina el RFLP y la PCR ya que, aunque el método deriva de la PCR, el polimorfismo que se detecta deriva de las variaciones que se dan en los sitios de restricción. Como desventajas presenta que son marcadores dominantes y que fragmentos generados con el mismo tamaño no tienen porque ser homólogos (Azofeifa-Delgado, 2006; Rico-Cabanias, 2005).

El análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) es una técnica simple y confiable. Se basa en la amplificación de segmentos de ADN al azar usando iniciadores con secuencias arbitrarias de nucleótidos. Estos iniciadores detectan polimorfismos, los cuales funcionan como marcadores genéticos y pueden ser usados para construir mapas genéticos que muestran caracteres dominantes (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col. 1990). Los RAPDs generan un número inmenso de marcadores y, al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor.



La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por la calidad y la pureza del ADN y por las condiciones de la reacción de PCR, como el número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura (Azofeifa-Delgado, 2006). Sin embargo, esta técnica ha sido usada exitosamente para determinar el nivel de diferenciación genética entre individuos (Hadrys y col., 1992; Milligan y col., 1994).

En papaya se han utilizado distintos tipos de marcadores para una gran cantidad de estudios. Magdalita y col. (1997a) diferenciaron híbridos mediante análisis de caracteres morfológicos, citológicos y RAPD. Jobin-Décor y col. (1997) estudiaron relaciones genéticas entre *Carica papaya* y especies silvestres relacionadas mediante patrones de isoenzimas y RAPD. Aradhya y col. (1999) usaron RFLP para confirmar la estrecha relación genética que existe entre las especies silvestres de Sur América y establecer linajes evolutivos. Van Droogenbroeck y col. (2002 y 2004) utilizaron AFLPs y RFLPs, respectivamente, para establecer relaciones filogenéticas entre *Vasconcellea* y *Carica*, dos géneros estrechamente relacionados de la familia Caricaceae. Kim y col., en el 2002, estudiaron la diversidad genética entre variedades y cultivares de *Carica papaya* mediante marcadores AFLPs, logrando obtener mapas de relaciones genéticas del género.

Los marcadores moleculares más utilizados en papaya son los microsatélites y RAPD, los cuales se han aplicado en la determinación de sexo, mediciones de diversidad genética, desarrollo de mapas de ligamiento e identificación de híbridos. Jobin-Décor y col. (1997) establecieron relaciones genéticas entre *Carica papaya* y especies silvestres relacionadas utilizando



RAPD; Magdalita y col. (1997a) identificaron híbridos de *Carica papaya* X *Carica cauliflora* mediante RAPD; Parasnis y col. (1999) revelaron diferencias específicas del sexo en papayas utilizando microsatélites; Parasnis y col. (2000) lograron establecer una metodología basada en RAPDs para diagnosticar el sexo de plántulas de papayas; Urasaki y col. (2000) identificaron marcadores RAPD específicos para papayas hembras y machos; Macedo y col. (2002) lograron identificar el sexo de papayas mediante marcadores RAPD; Kyndt y col. (2005) aislaron y caracterizaron microsatélites de *Vasconcellea heilbornii*; Ocampo-Pérez y col. (2006) identificaron microsatélites en *Carica papaya* y los transfirieron a especies de *Vasconcellea*; Eustice y col. (2007) desarrollaron y aplicaron microsatélites para analizar el genoma de la papaya, desarrollando mapas genéticos entre especies de *Carica*.



### 3. Problemática

Debido a la extraordinaria productividad de la papaya, no solo como cultivo frutícola, sino también como fuente bioquímica, es una de las principales especies hortícolas de los trópicos. El virus de la mancha anular de la papaya (VMAP) provoca una enfermedad destructiva de la planta y afecta todas las regiones donde la papaya es cultivada.

Para combatir esta enfermedad se ha recurrido a la hibridación interespecífica, y para comprobar ésto se utilizan varias técnicas. El análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) es una herramienta sencilla y confiable que muestra los polimorfismos entre especies y/o variedades aún en etapas tempranas de la planta donde otras técnicas no moleculares tienen limitaciones.



#### 4. Justificación

La principal causa de pérdida de cultivos de papaya en todo el mundo es la enfermedad provocada por el virus de la mancha anular de la papaya (Papaya Ring Spot Virus, VMAP), afectando notablemente el rendimiento y la calidad del fruto.

Diversos autores han reportado especies silvestres que presentan tolerancia a este virus, tal es el caso de *Carica sp.* la cual no ha sido explotada con fines comerciales debido a que sus frutos no son comestibles. Sin embargo, posee esta importante característica que puede ser transferida a una especie con un alto valor comercial, como es el caso de la *Carica papaya* var. maradol, mediante mejoramiento genético convencional asistida con herramientas de biotecnología, como el rescate de embriones.

Es necesario constatar la hibridación a nivel molecular para comprobar el porcentaje de carga genética de los híbridos  $R_2$ , en relación a los parentales y verificar que la hibridación fue exitosa. Para esto, el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar es una técnica rápida, económica, sencilla y confiable para comprobar la hibridación, aún en estadios inmaduros de las plantas.



## 5. Objetivo

Evaluar la hibridación de plantas  $R_2$  comparando genéticamente los híbridos con sus progenitores.

---

## 6. Hipótesis

- Los híbridos seleccionados muestran mayor carga genética de maradol que de la especie silvestre (*Carica sp.*).



## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de individuos visiblemente sanos de 10 plantas de maradol, 2 plantas de papaya silvestre, 4 plantas  $F_2$  y 15 plantas  $R_2$ , en la parcela experimental utilizada para la hibridación en el campo del INIFAP, en la Huerta, Jalisco (Tabla 1).

Las hojas se guardaron en bolsas de plástico y se transportaron en hielo al laboratorio de biotecnología vegetal del CIATEJ donde se cortaron y congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta llevar a cabo las extracciones de ADN.

También se colectó material vegetal de la papaya silvestre proveniente de Mérida y de la variedad Hawaiana.

Tabla 1. Relación de ejemplares colectados para el análisis RAPD.

No de Muestra	Ejemplar	No de Muestra	Ejemplar
1	$F_{2a}$	18	Retrocruza 2, 44C
2	$F_{2b}$	19	Retrocruza 2, 34IV
3	$F_{2c}$	20	Parental silvestre H
4	$F_{2d}$	21	Parental silvestre M
5	Retrocruza 2, 44F	22	Parental maradol 1
6	Retrocruza 2, 44B	23	Parental maradol 2
7	Retrocruza 2, 44D	24	Parental maradol 3
8	Retrocruza 2, 44E	25	Parental maradol 4
9	Retrocruza 2, 45I	26	Parental maradol 5
10	Retrocruza 2, 45II	27	Parental maradol 6
11	Retrocruza 2, 45III	28	Parental maradol 7
12	Retrocruza 2, 45V	29	Parental maradol 8
13	Retrocruza 2, 44VI	30	Parental maradol 9
14	Retrocruza 2, 44VII	31	Parental maradol 10
15	Retrocruza 2, 34VIII	32	Control hawai
16	Retrocruza 2, 34IX	33	Control mérida
17	Retrocruza 2, 44A		



## 7.2. Extracción de ADN

Se trituro el tejido foliar hasta su pulverización en un mortero con nitrógeno líquido, y se colocaron 250 mg de muestra en tubos eppendorf de 2 mL.

Se hizo la extracción de ADN con el kit de extracción de SIGMA<sup>®</sup> (GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kit) siguiendo las recomendaciones del fabricante para tal propósito. Después de la extracción se agregaron 5 µl de ARN-asa (10 mg/mL), para eliminar el ARN y se incubó por lo menos 1 hora a temperatura ambiente.

## 7.3. Estimación de la concentración de las muestras

A partir de la solución de ADN obtenida para cada muestra se preparó una dilución de 1:100 (10 µL del ADN de cada muestra más 990 µl de TE), para estimar la concentración y la pureza del ADN por medio de un espectrofotómetro de luz ultravioleta; la concentración se obtuvo mediante la fórmula:

$$[\text{ADN (ng/}\mu\text{L)}] = (\text{DO}_{260})(\text{FD})(50 \mu\text{g/}\mu\text{L})$$

Donde:

$\text{DO}_{260}$  = Densidad óptica de la solución de ADN leída a la longitud de onda de 260 nm

FD = Factor de dilución

$50 \mu\text{g/}\mu\text{L}$  = Equivalencia en ADN de una unidad de densidad óptica a 260 nm

La pureza del ADN se evaluó como la proporción de las lecturas a longitudes de onda de 260 a 280 nm ( $260/280$ ) donde valores entre 1.8 y 2.0 indican ADN con pureza suficiente para la reacción de PCR. Una relación



inferior a 1.8 indica la existencia de proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra. Valores mayores de 2.0 indican contaminación por ARN, cloroformo, fenol o alguna otra sustancia orgánica.

A la par con esta cuantificación se evaluó la calidad del ADN obtenido para cada muestra mediante un gel de calidad, cargando 10  $\mu\text{L}$  de ADN más 2  $\mu\text{L}$  de 5X de azul de bromofenol, en un gel de agarosa (ultrapura, Invitrogen) al 1 %. Se incluyó como estándar de concentración conocida ADN de *Arabidopsis* a 50 ng/ $\mu\text{L}$ . La electroforesis se desarrollo en una cámara de electroforesis horizontal a 80 Volts durante una hora. Transcurrido este tiempo el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas obtenidas por medio de un transiluminador de luz ultravioleta y se digitalizó la imagen.

## **7.4. RAPD**

### **7.4.1. Iniciadores**

Se usaron 6 iniciadores de "AMERSHAM BIOSCIENCE" (iniciadores 1-4, 9 y 10) y 5 iniciadores de "INVITROGEN" (iniciadores 5-8 y 11) utilizados previamente por Magdalita y col. (1997a) (Tabla 2).



Tabla 2. Secuencias de los iniciadores utilizados

Iniciador 1	5'-d(GGT GCG GGA A)-3'
Iniciador 2	5'-d(GTA GAC CCG T)-3'
Iniciador 3	5'-d(AAG AGC CCG T)-3'
Iniciador 4	5'-d(CCC GTC AGC A)-3'
Iniciador 5	5'-d(GAA CGG ACT C)-3'
Iniciador 6	5'-d(CAA ACG GGT G)-3'
Iniciador 7	5'-d(GGG TAA CGC C)-3'
Iniciador 8	5'-d(CCT TGA CGC A)-3'
Iniciador 9	5'-d(AAG CCT CGT C)-3'
Iniciador 10	5'-d(TGA GTG GGT G)-3'
Iniciador 11	5'-d(CAA ACG TCG G)-3'

#### 7.4.2. Mezcla de reacción para RAPD

El volumen total para la reacción fue de 12.55  $\mu$ l, constituido por los siguientes componentes:

- Agua destilada ultra pura	5.4 $\mu$ l
- Buffer 10 X	1.25 $\mu$ l
- MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 $\mu$ l
- dNTPs (10 mM)	1.25 $\mu$ l
- ADN	1 $\mu$ l
- Iniciador (5 pmoles/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
- Taq polimerasa (Invitrogen 5u/ $\mu$ l)	0.15 $\mu$ l

#### 7.4.3. Amplificación y condiciones de la PCR

La amplificación mediante la reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador TECHNE-TC 412 usando el programa de amplificación que se detalla en la tabla 3.



Al término de la reacción de amplificación, las muestras fueron guardadas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta realizar la electroforesis.

Tabla 3. Temperaturas y tiempo de la reacción de PCR

Temperatura	Tiempo
94°C	3 minutos
<b>4 ciclos</b>	
94°C	30 segundos
36°C	1 minuto
72°C	2 minutos
<b>42 ciclos</b>	
93°C	30 segundos
35°C	1 minuto
72°C	2 minutos
<b>4°C Al final de los ciclos</b>	

#### 7.4.4. Electroforesis

La separación de los fragmentos obtenidos por iniciador para cada muestra se efectuó en geles de agarosa al 2% y bromuro de etidio (10mg/mL), durante 3 horas a 120 Volts en una cámara BIO-RAD.

A cada muestra se le agregaron 2  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol y en cada pozo se cargaron 12.5  $\mu\text{l}$ . En el primer y último pozo se cargaron 2  $\mu\text{l}$  del marcador de peso molecular de 100 pb. Después de la electroforesis se procedió a la tinción del gel durante 15 min en una solución de bromuro de etidio. Se utilizó un amplificador de imágenes marca "Bio Rad" para fotografiar los geles.



#### 7.4.5 Análisis de datos

Las bandas obtenidas fueron registradas en base a un código binario dando al valor 1 a la presencia y 0 a la ausencia de bandas hasta formar una matriz de presencias y ausencias, la cual fue usada para calcular una matriz de similaridad genética utilizando diferentes índices (SM, Dice y Jacar). La matriz de similaridad se usó para generar un dendrograma con el algoritmo UPGMA (por sus siglas en inglés). Se estimó el coeficiente de correlación cofenética para determinar la veracidad del arreglo de los agrupamientos entre las matrices de similaridad y cofenética para así determinar cual índice se aplicaría. Se utilizó el software NTSYS-pc ver 2.1 (Rohlf, 2000).

Se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (ACoP), con el propósito de trazar relaciones no jerárquicas entre los ejemplares estudiados. Los valores y vectores propios se calcularon con el uso de la matriz de correlaciones y la opción *Eigen*, el plano en dos dimensiones se trazó usando la opción *2Dplot*, ambas aplicaciones incluidas en el software NTSYS-pc 2.1. (Rohlf, 2000).



## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Extracción de ADN y estimación de la concentración de las muestras

La extracción de ADN es un paso importante en cualquier técnica que emplea marcadores moleculares. La calidad del ADN depende, en gran parte, del método de extracción, el tipo de tejido y la edad del mismo. De tal manera que a veces es necesario usar más de un método de extracción o hacer ajustes a la metodología para obtener ADN en la cantidad y calidad deseadas, así mismo, la concentración de ADN molde así como la presencia de algunos contaminantes pueden afectar significativamente, la eficiencia de la amplificación.

La calidad del ADN obtenido se confirmó mediante geles de agarosa (Figura 4). No se presentó degradación del ADN, ni contaminación por ARN u otros productos; de igual modo, se observó una banda de ADN total bien definida y en concentraciones similares para todas las muestras extraídas, por lo que el método de extracción utilizado fue igualmente eficiente para todos los individuos.

Las lecturas de absorbancia de todos los individuos se presentan en la tabla 4. La cantidad de ADN para todas las muestras fue similar (alrededor de 45-50 ng/ $\mu$ l, lo que concuerda con lo obtenido previamente en el gel de calidad). En cuanto a la pureza, las relaciones 260/280 no fueron muy buenas (Tabla 4), sin embargo, en el gel de calidad no se observó que el ADN



estuviera degradado o contaminado por lo que se decidió usar el ADN sin hacer otro paso de purificación, que si bien pudiera mejorar la calidad, se correría el riesgo de perder ADN.

Las concentraciones de ADN recomendadas para hacer una reacción de RAPDs se encuentran entre 10 y 100 ng/μl (Welsh y McClelland, 1990). Dado que las concentraciones fueron muy homogéneas se decidió usar las muestras sin hacer ninguna dilución y, dado que en las pruebas preliminares los resultados fueron satisfactorios, se mantuvo esta concentración para el resto del trabajo.

Tabla 4. Índices de absorbancia

Muestra	DO280	DO260	Con. ng/μl	Muestra	DO280	DO260	Con. ng/μ
1	0.0825	0.0913	45.65	18	0.0877	0.0964	48.20
2	0.0825	0.0925	46.25	19	0.0927	0.1009	50.45
3	0.0860	0.0948	47.40	20	0.0837	0.0923	46.15
4	0.0877	0.0978	48.90	21	0.0856	0.0936	46.80
5	0.0822	0.0902	45.10	22	0.0846	0.0934	46.70
6	0.0826	0.0905	45.25	23	0.0844	0.0958	47.90
7	0.0822	0.0914	45.70	24	0.0845	0.0933	46.65
8	0.0869	0.0966	48.30	25	0.0835	0.0930	46.50
9	0.0824	0.0911	45.55	26	0.0864	0.0961	48.05
10	0.0827	0.0909	45.45	27	0.0847	0.0926	46.30
11	0.0830	0.0911	45.55	28	0.0851	0.0946	47.30
12	0.0851	0.0943	47.15	29	0.0835	0.0927	46.35
13	0.0821	0.0909	45.45	30	0.0843	0.0926	46.30
14	0.0817	0.0899	44.95	31	0.0837	0.0926	46.30
15	0.0811	0.0902	45.10	32	0.0844	0.0934	46.70
16	0.0816	0.0903	45.15	33	0.0842	0.0935	46.75
17	0.0834	0.0925	46.25				

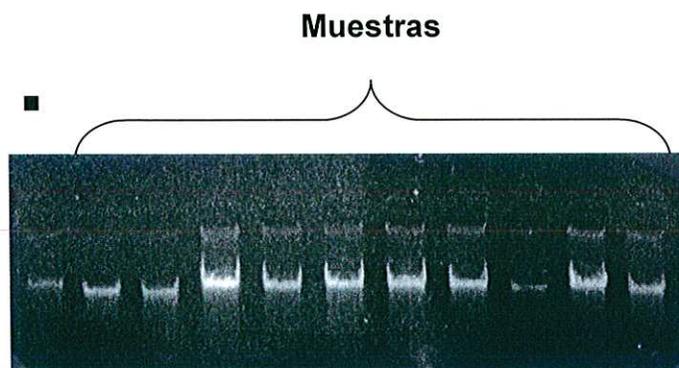


Figura 4. Gel de calidad de ADN de híbridos de papaya (■ = *Arabidopsis*).

## 8.2. Niveles de polimorfismo

Los once iniciadores utilizados en las reacciones fueron informativos, con base en el número de bandas obtenidas y en el nivel de polimorfismo que cada iniciador presentó. El patrón de bandas obtenido para el iniciador 6 se presenta en la figura 5, mientras que el resto de los geles en el anexo 2.

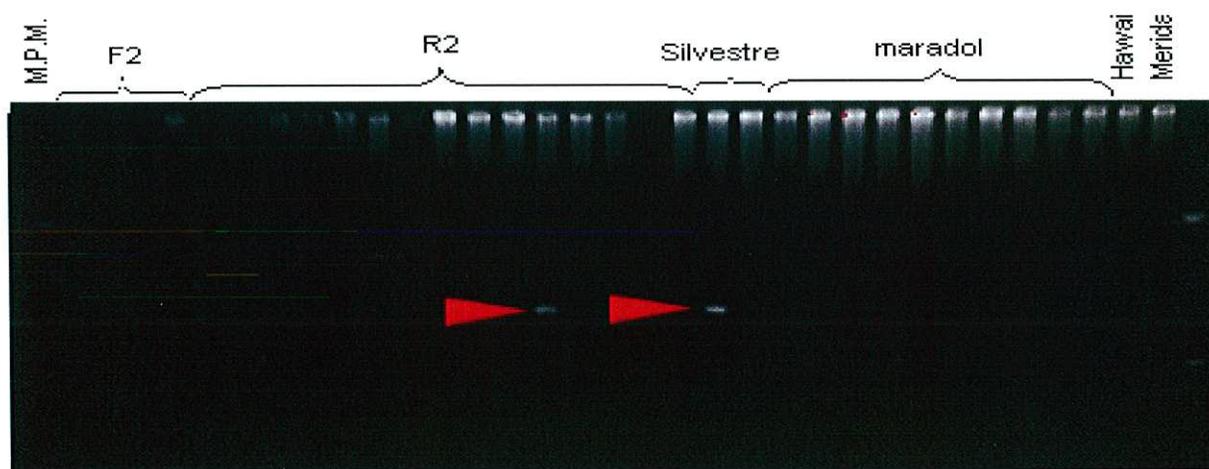


Figura 5. Ejemplo de patrón de bandas obtenido con el iniciador 6 (M.P.M.: Marcador de Peso Molecular; R2: Retrocruzas2; Silvestre: *Carica sp.*; maradol: *Carica papaya* var. maradol; F2, Hawaii y Mérida: controles)



Con los 11 iniciadores RAPD utilizados se obtuvieron 163 bandas en total con un promedio de 14.88 bandas por iniciador y un total de 139 (85.27 %) bandas polimórficas. Resultados similares a los nuestros los encontraron Jobin-Decor y col. (1997), ellos obtuvieron 188 bandas utilizando 14 iniciadores en 8 muestras al analizar relaciones genéticas entre *Carica papaya* y especies silvestres relacionadas, mientras que Xu y Gai (2003), utilizando 20 iniciadores obtuvieron 177 bandas, de las cuales 66 (37.3%) fueron polimórficas y con un promedio de 5.5 bandas por iniciador.

En el análisis de bandas por iniciador (Tabla 5) se observó que el iniciador 4 es el que presenta un mayor número de bandas totales (28) y también un mayor número de bandas polimórficas (25), aunque no es el iniciador con mayor porcentaje de polimorfismo (89.28 %), estando por debajo de los iniciadores 3 y 7 (90 % y 89.47 %, respectivamente), y los iniciadores 6 y 9, en los que todas sus bandas fueron polimórficas (100%).

El iniciador 9 presentó 8 bandas totales y el iniciador 6 mostró 11, por lo tanto, se considera que el iniciador que mayor información arrojó fue el 6.

El iniciador 8 presentó sólo 6 bandas y ninguna fue polimórfica, por lo tanto fue el iniciador que dio menos información.

Sobresale el hecho de que los iniciadores utilizados previamente por Magdalita y col. (1997a) en su identificación de híbridos interespecíficos de papaya (iniciadores 5, 6, 7, 8 y 11), no arrojaron mayor información que los nuevos iniciadores que se probaron (iniciadores 1, 2, 3, 4, 9 y 10).



Tabla 5. Número de bandas y polimorfismo por iniciador

Iniciador	Número de Bandas	Número de bandas polimórficas	% Porcentaje de polimorfismo
1	9	8	88.88 %
2	19	16	84.21 %
3	20	18	90 %
4	28	25	89.28 %
5	18	16	88.88 %
6	11	11	100 %
7	19	17	89.47 %
8	6	0	0 %
9	8	8	100 %
10	18	16	88.88 %
11	7	4	57.14 %

En la tabla 6 se puede observar que el grupo formado por los organismos de las retrocruzas 2 ( $R_2$ ), y con los iniciadores utilizados, son los que presentaron el número más elevado de bandas polimórficas con un total de 69 (53.48 %). Seguido por el grupo de individuos formado por la variedad maradol con un número de bandas polimórficas total de 58 (50 %). En contraparte el grupo que presentó menos variabilidad (bandas polimórficas) fue el formado por la especie silvestre, el cual únicamente presenta 36 bandas (34.61 %).

Tabla 6. Nivel de polimorfismo por grupos estudiados

Grupo	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
Maradol	58	50.00%
Silvestre	36	34.61%
$R_2$	69	53.48%
$F_2$	55	45.08%



Estas diferencias en los niveles de polimorfismo no eran los esperados, pues los individuos de especies silvestres tienden a mostrar mayor variabilidad que las especies y variedades cultivadas, ya que al haber sufrido un manejo agrícola, se puede haber reducido su acervo genético, como reporta Xu y Gai (2003) en estudios de diversidad genética de soya, en el que especies silvestres muestran mayor diversidad que las cultivadas, obteniendo 64 bandas polimórficas para los individuos silvestres y solo 46 para los cultivados. Igualmente Arana-Gutiérrez (2006) reportó, en sus resultados de caracterización de *Agave angustifolia*, que poblaciones silvestres mostraron mayor diversidad que las cultivadas. Lo mismo se esperaba con las retrocruzas en relación a las  $F_2$ .

Kim y col. (2002) reportan resultados similares a este trabajo. En un estudio de diversidad genética entre diferentes cultivares de *Carica papaya* y especies silvestres de *Carica*, utilizando AFLP encontraron cierto grado de polimorfismo (3 - 6%) en especies cultivadas, cuando esperaban encontrar 0% y explican que la posible causa de esta variabilidad puede ser una fuente de contaminación de polen de cultivos vecinos, pudiendo afectar hasta el 5% de las semillas producidas.

Por otro lado, el número reducido de individuos analizados de la especie silvestre y de los individuos  $F_2$  (2 y 4 respectivamente) pudieron haber influido en el bajo nivel de polimorfismo de estos grupos en relación con el número de individuos analizados de maradol y de retrocruzas, de los cuales se analizaron 10 y 15 muestras respectivamente.



Los resultados indican que el material genético de los dos parentales fue exitosamente incorporado en el híbrido. En la tabla 7 se observa que del total de bandas (129) obtenidas para  $R_2$ , el 68.99 % de éstas son compartidas tanto por maradol como por la especie silvestre. El 17.82 % está presente sólo en maradol y el 6.97 % en la especie silvestre. Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta que las retrocruzas se hicieron hacia maradol.

El 6.20 % restante son bandas nuevas que sólo se presentaron en las retrocruzas y pueden ser el resultado de una recombinación. Chen y col. (2005), en su trabajo sobre producción de híbridos somáticos interespecíficos con *Brassica juncea*, reportan también bandas parciales de los dos parentales presentes en ciertos híbridos que se presentaron como resultado de la recombinación del genoma.

Tabla 7. Bandas compartidas por las retrocruzas y los parentales

	No. de bandas	Porcentaje del total de bandas
En todas	89	68.99 %
En $R_2$ y Silvestre	9	6.97 %
En $R_2$ y Maradol	23	17.82 %
Solo en $R_2$	8	6.20 %



menor variabilidad, tienen un valor de 7.79. Estos mismos resultados obtuvieron Kim y col. (2002) al comparar los niveles de polimorfismo con los valores de similaridad entre cultivares de *C. papaya* y distintas especies de *Carica*.



### 8.4. Dendrograma

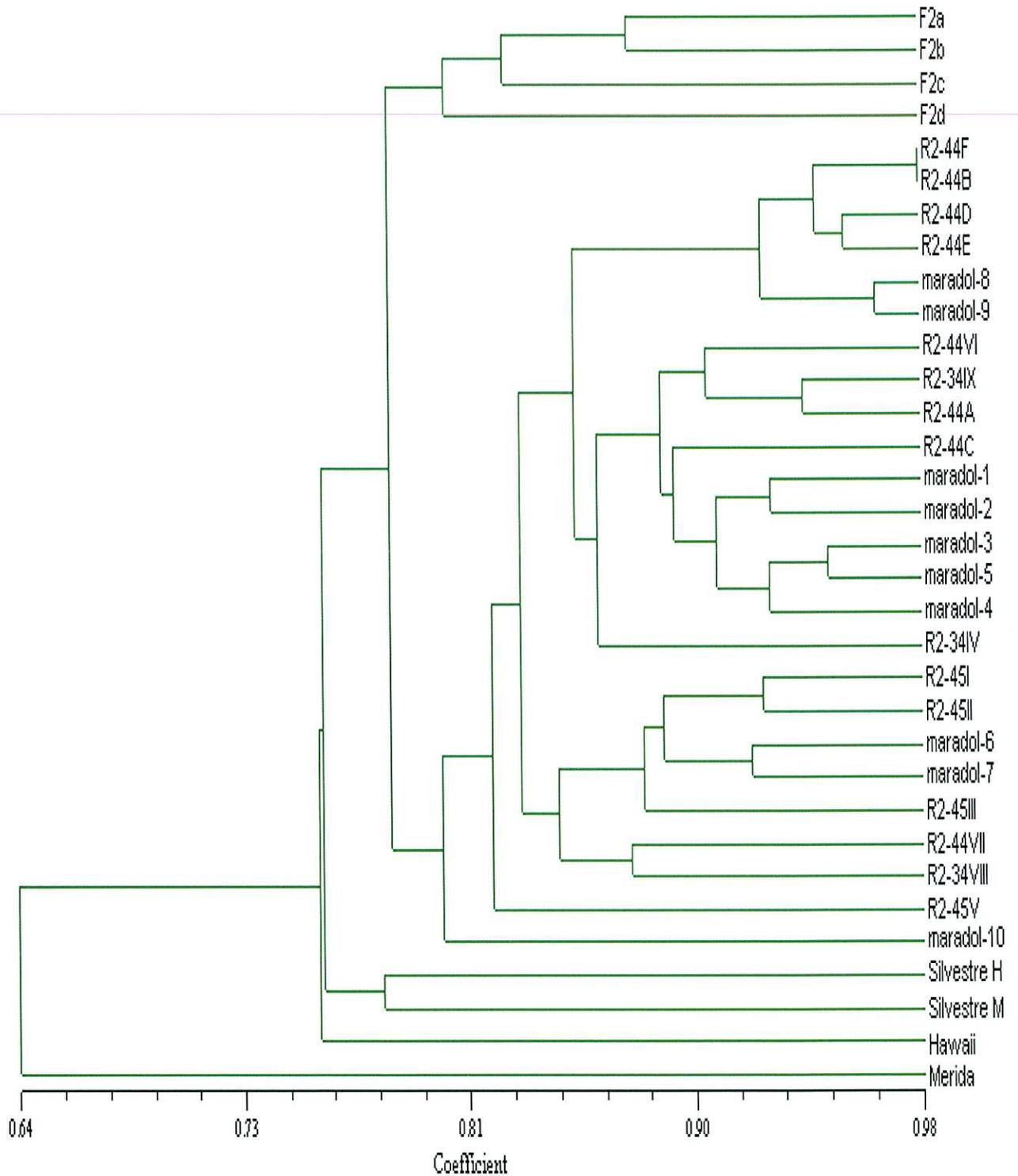


Figura 6. Dendrograma de agrupamiento mediante el coeficiente SM y el método de agrupamiento UPGMA, de individuos de papaya, a partir de marcadores RAPD ( $r = 0.89$ ).



Para verificar que el dendrograma obtenido se ajusta correctamente con los datos obtenidos, se estimó el coeficiente de correlación cofenética y se obtuvo el valor de "r". Esta prueba puede ser interpretada de la siguiente manera:

Nivel de interpretación.

Si  $\underline{r}$  da un valor de 0.9 o mayor tiene muy buen ajuste.

Si  $\underline{r}$  es menor de 0.9 pero igual o mayor a 0.8 el ajuste es bueno.

Si  $\underline{r}$  es menor a 0.8 pero igual o mayor a 0.7 tiene un ajuste pobre.

Si  $\underline{r}$  es igual o menor de 0.7 entonces el ajuste es muy pobre.

Se probaron diferentes índices de similaridad y al comparar los valores cofenéticos de los distintos índices probados se encontró que los tres SM, Dice y Jacar, dan valores de "r" muy cercanos entre si (0.890, 0.909 y 0.904 respectivamente). A pesar de que el valor de "r" del índice SM es el menor, se decidió utilizar éste para el análisis, pues agrupa los individuos  $F_2$  dentro de la misma línea, mientras que los otros índices separan a uno de los individuos  $F_2$ .

El dendrograma de agrupamiento generado a partir de los datos de 11 iniciadores RAPD, se presenta en la figura 6. En éste se observa la clara separación de los individuos usados como controles, hawaii y mérida, mientras que en el primer caso se trata de una variedad de papaya comercial (la cual se separa 0.76 de coeficiente de similaridad del grupo principal), la segunda es una especie silvestre que fue colectada en el estado de Yucatán, por lo que su separación con respecto al grupo principal fue mayor (similaridad de 0.64).



El grupo principal se compuso de varios subgrupos, al 0.79 de similaridad se separaron las dos muestras de la especie silvestre, mientras que a un 0.80 de similaridad se divide un grupo formado por todas las retrocruzas y las muestras de maradol, separándose claramente de los individuos  $F_2$ . Los individuos de maradol y las R2 se mezclaron sin ningún patrón aparente, demostrando que, gracias a las dos retrocruzas, los híbridos están más cercanos a maradol. Van Droogenbroeck y col. (2006) analizaron especies silvestres de *Vasconcellea* e híbridos naturales de estas mismas y obtienen resultados similares en su dendrograma, pues los híbridos se agruparon junto con *V. stipulata*, especie con la que se sugiere ha sufrido retrocruzas.

Tanto los índices de similaridad, como el dendrograma, mostraron gran diferencia entre los individuos de maradol con la variedad Hawaiana, lo que sugiere orígenes completamente distintos. Mientras que Kim y col. (2002) muestran una similitud muy marcada entre varias variedades hawaianas.

Se observó también una marcada diferencia entre *Carica papaya* y las otras dos especies silvestres. Resultados similares obtuvieron Jobin-Decor y col. (1997) en un estudio sobre diversidad genética de papaya, comparando 6 especies de *Carica*, en el que *C. papaya* fue la más alejada. Kim y col. (2002) también observaron que *C. papaya* es la menos semejante a las otras especies de *Carica*.

### 8.5. Análisis de coordenadas principales

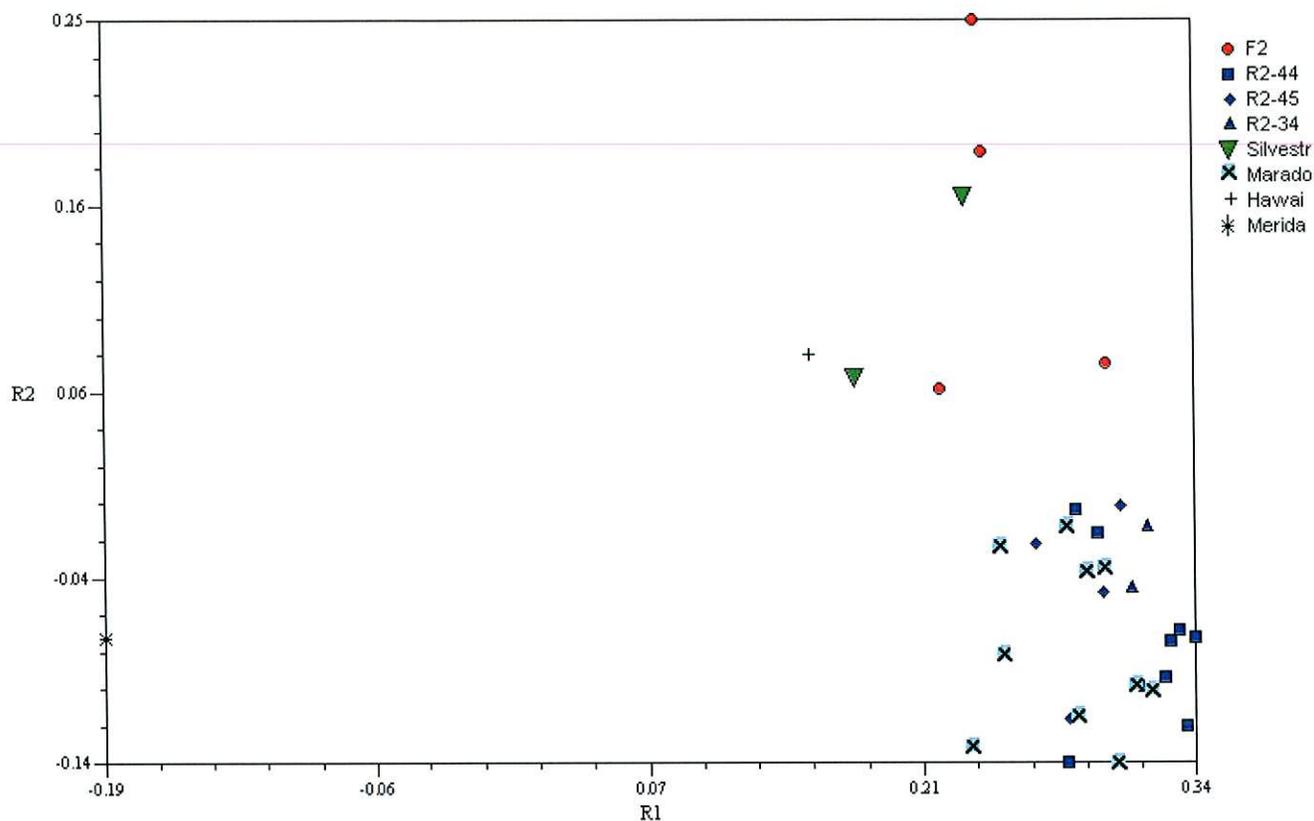


Figura 7. Análisis de coordenadas principales (2D).

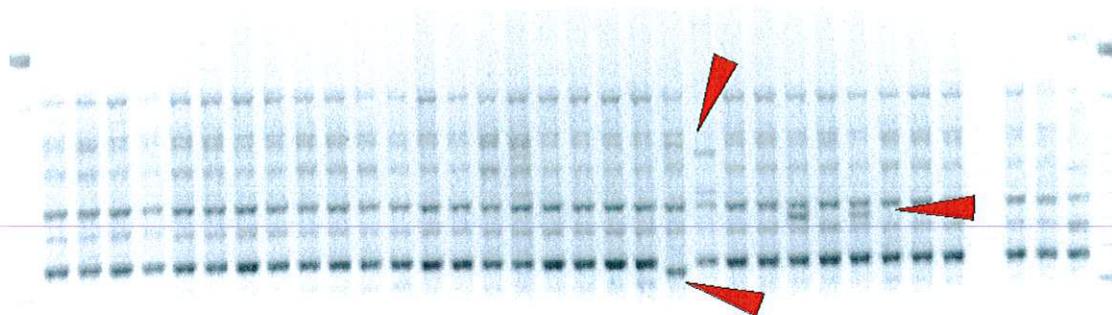
En este análisis (Figura 7) se reafirma lo expuesto por la matriz de similaridad y el dendrograma. Se observa una clara agrupación entre individuos de maradol y las retrocruzas, lo cual indica que las retrocruzas resultaron exitosas. Van Droogenbroeck y col. (2006) también presentan sus muestras una distribución similar, agrupando los híbridos con la especie que se sugiere hubo retrocruza.

Los individuos F2 se separan de este grupo y se acercan más a las muestras de la especie silvestre, indicando que probablemente son producto de la cruce de individuos F1 con la especie silvestre.

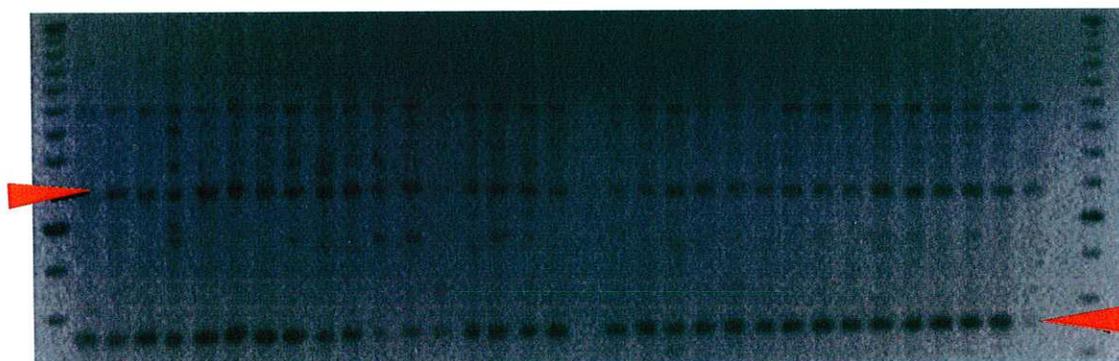


La especie de Mérida se separa claramente de todas las demás muestras evidenciando una marcada diferencia aun con la especie silvestre utilizada para la hibridación, mientras que la variedad hawaiana si se agrupa con ésta última.

---



Iniciador 10



Iniciador 11



## 9. Conclusiones

1. Los 11 iniciadores utilizados para la técnica RAPD proporcionaron suficiente información para la diferenciación de los grupos de individuos estudiados, tanto entre los parentales, como entre estos y los híbridos.
2. Los híbridos R2 analizados están más cercanamente relacionados con la variedad maradol que con la especie silvestre. Lo que nos indica una mayor carga genética hacia este progenitor.
3. Se observa una gran variabilidad genética en la variedad maradol, lo que sugiere que no es una línea pura o que tiene contaminación de polen externo en los sitios de producción de semilla
4. Aunque no se ha logrado determinar el nombre de las especies silvestres que se analizaron, se observa una gran distancia genética entre la *Carica sp.* y la proveniente de Mérida.
5. La especie *C. papaya* está genéticamente muy alejada de las demás especies de *Carica*.
6. La técnica RAPD es un método confiable para identificar hibridación en papaya.
7. Es necesario probar RFLP y AFLP para observar codominancia y heterocigosis.



## 10. Bibliografía

- Alvizo-Villasana, H. F. y C. R. Matluk. 1987. Resistencia al virus de la mancha anular del papayo en *Carica cauliflora*. Rev. Méx. Fitopatología. 5: 61-62.
- Aradhya, M., R. Manshardt, F. Zee y C. Morden. 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. Genet. Resour. Crop Ev. 46: 579-586.
- Arana-Gutiérrez J. P. 2006. Uso de Marcadores Moleculares para la Caracterización de *Agave angustifolia* Haw del Estado de Jalisco. Tesis de Maestría. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 1-83.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en Frutales del Trópico. Agron. Mesoam. 17: 221-242.
- Badillo, V. 1993. Caricaceae, Segundo esquema. Publicada por la asociación de Profesores, Alcance 43, Universidad Central de Venezuela, Maracay. Venezuela. 1-111.
- Beckmann, J. S. y M. Soller. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica 35: 111-124.
- Cabrera-Ponce, J. L., A. Vegas-García y L. Herrera-Estrella. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. Plant Cell Rep. 15: 1-7.



- Chan, H. T. y C. S. Tang. 1979. The chemistry and biochemistry of papaya. En: Tropical Foods (Inglett, G. E. y G. Charolambus, eds). V. 1. Academic Press, New York. 33-53.
- Chen, L. P., M. F. Zhang, C. S. Li y Y. Hirata. 2005. Production of interspecific somatic hybrids between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*Brassica oleracea*). Plant Cell, Tiss. Org. 80: 305-311.
- Conover, R. 1964. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya viruses diseases of minor importance in Florida. Proc. Fla. Hort. Soc. 77: 444-448.
- Cook, A. 1972. Virus diseases of Papaya. Fla. Agric. Exp. Sta. Bull. 750: 1-19.
- Eustice M., Q. Yu, C. W. Lai, S. Hou, J. Thimmapuram, L. Liu, M. Alam, P. H. Moore, G. G. Presting y R. Ming. 2007. Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. Tree Genet. Genom. 3: 389-401.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2006. Production year-book. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma. <http://faostat.fao.org>.
- Fitch, M. M., R. M. Manshardt, D. Gonsalves, J. Slighton y J. C. Sandford. 1993. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9: 189-194.
- Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. Ann. Rev. Phytophatol. 36: 415-417.
- Greef, B. y L. Triest. 1999. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for hybrid detection in *Sciprus* from the river Schelde (Belgium). Mol. Ecol. 8: 379-386.



- Gutiérrez-Mora, A. 2002. Micropropagación y mejoramiento genético de papaya (*Carica papaya*) var. maradol. Tesis Doctoral. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 1-83.
- Hadrys, H., M. Balick, y B. Schierwater. 1992 Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55–63.
- Hollingsworth W. O., C. B. Christie, M. A. Nichols, y H. F. Neilson. 1998. Detection of variation among and within asparagus hybrids using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *New Zeland J. Crop Hortic. Sci.* 26: 1-9.
- Hossain, M., S. M. Rahman, R. Islam y O. I. Joarder. 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explant of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Rep.* 13: 99-102.
- Ibar, L. 1979. Cultivo del aguacate, chirimoya, mango y papaya. Ed Aedos. España. 1-213.
- Jauhar, P. P. 2006. Modern Biotechnology as an Integral Supplement to Conventional Plant Breeding: The Prospects and Challenges. *Crop Sci.* 46: 1841–1859.
- Jobin-Décor, M. P., G. C. Graham, R. J. Henry y R. A. Drew. 1997. RAPD and isozyme analysis of genetic relationship between *Carica papaya* and wild relatives. *Genet. Resour. Crop Evol.* 44: 471–477.
- Jug, T., P. Dovoc, J. Pohar y A. Snoi. 2004. RAPD Analysis as a Tool for Discriminating Marble Trout From Hybrids (Marble Trout X Brown Trout) in the Zones of Hybridization. *J. Anim. Breed. Genet.* 121: 156-162.



- Kim, M.S., P.H. Moore, F. Zee, M.M.M. Fitch, D.L. Steiger, R.M. Manshardt, R.E. Paull, R.A. Drew, T. Sekioka, y R. Ming. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*. 45: 503-512.
- Kyndt, T., A. Haegeman, S. Van Glabeke, I. Maertens, B. Van Droogenbroeck, I. Roldan-Ruiz y G. Gheysen. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in the highland papaya *Vasconcellea* × *heilbornii* V. Badillo (Caricaceae). *Mol. Ecol. Notes*. 5: 590–592.
- Lötschert, W. y G. Beese. 1983. Guía de las plantas tropicales. Ed. Omega. España. 1-287.
- Macedo, E. G., C. L. Soares y H. Actis. 2002. Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica*. 127: 179-184.
- Magdalita P. M., V. N. Villegas, R. V. Pimentel y R. G. Bayot. 1988. Reaction of papaya (*Carica papaya*) and related species to ringspot virus. *Philipp. J. Crop Sci*. 13: 129-132.
- Magdalita, P. M., R. A. Drew, S. W. Adkins y I. D. Godwin. 1997a. Morphological, molecular and cytological analysis of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet*. 95: 224-229.
- Magdalita, P. M., D. M. Persley, I. D. Godwin, R. A. Drew y S. W. Adkins. 1997b. Screening *Carica papaya* x *C. Cauliflora* hybrids for resistance to papaya ringspot virus-type P. *Plant Pathol*. 46: 837-841.
- Magdalita, P. M., R. A. Drew, I. D. Godwin y S. W. Adkins. 1998. An efficient hybridization protocol for *Carica papaya* L. x *C. cauliflora* Jacq. *Aust. J. Exp. Agr*. 38: 523-530.



- Mallikarjuna K. A., R. M. Manshardt, F. Zee y C. W. Morden, 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genet. Resour. Crop Ev.* 46: 579-586.
- Manshardt, R. M. y T. Wenslaff. 1989a. Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. *J. Amer. Soc. Sci.* 114: 684-689.
- Manshardt, R. M. y T. Wenslaff. 1989b. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. *J. Amer. Soc. Sci.* 114: 689-694.
- Medora, R. S., J. M. Campbely y G. P. Mell. 1973. Proteolytic enzymes in papaya cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 91: 79-92.
- Milligan, B. G., J. Leebens-Mack y A. E. Strand. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Mol. Ecol.* 3: 423-435.
- Ocampo-Perez, J., D. Dambier, P. Ollitrault, G. C. D'eeckenbrugge, P. Brottier, Y. Froelicher y A. Risterucci. 2006. Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 212-217.
- Parasnis, A. S., W. Ramakrishna, K. V. Chowdari, V. S. Gupta y P. K. Ranjekar. 1999. Microsatellite (GATA)<sub>n</sub> reveals sex-specific differences in Papaya. *Theor Appl Genet.* 99: 1047-1052.
- Parasnis, A. S., V. S. Gupta, S. A. Tamhankar y P. K. Ranjekar. 2000. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Mol. Breeding* 6: 337-344.



- Rico-Cabanas, L. 2005. Nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los cítricos. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona. España. 1-222.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1 Exceter Software, New York U.S.A.
- SAGARPA. 2006. Libro estadístico. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México.  
<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.
- Shasany A. K., M. P. Darokar, S. Dhawan, A. K. Gupta, S. Gupta, A. K. Shukla, N. K. Patra y S. P. S. Khanuja. (2005). Use of RAPD and AFLP markers to identify inter-and intra-specific hybrids in Mentha. J. Heridity. 96: 542–549.
- Tanksley, S. 1993. Mapping polygenes. Ann. Rev. Genet. 27: 205-233.
- Ude, G., M. Pillay, D. Nwakanma y A. Tenkouano. 2002. Analysis of genetic diversity and sectional relationships in Musa using AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 104: 1239–1245.
- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Rayano, H. Tanaka, H. Oku, I. Chinen y R. Terauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). Theor. Appl. Genet. 104: 281–285.
- Van Droogenbroeck, B., P. Breyne, P. Goetghebeur, E. Romeijn-Peeters, T. Kyndt y G. Gheysen. 2002. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. Theor. Appl. Genet. 105: 289–297.

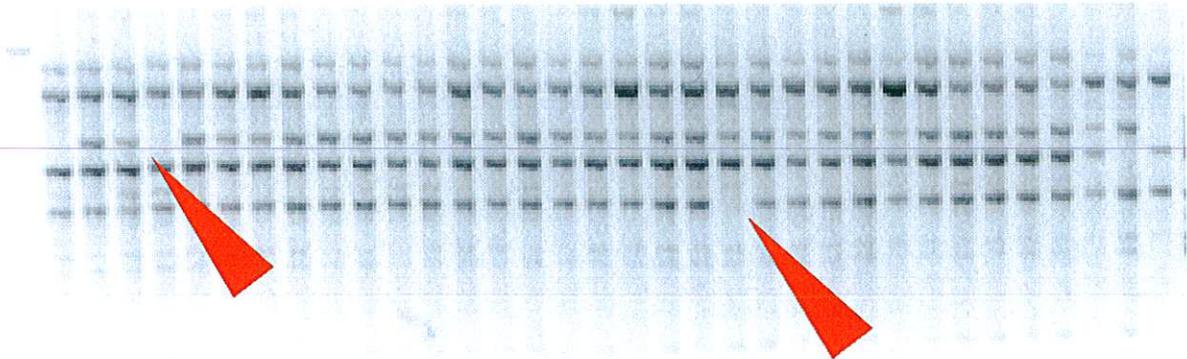


- Van Droogenbroeck, B., T. Kyndt, I. Maertens, E. Romeijn-Peeters, X. Scheldeman, J. P. Romero-Motochi, P., Van Damme, P. Goetghebeur y G. Gheysen. 2004. Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (*Caricaceae*) using PCR-RFLP. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1473–1486.
- Van Droogenbroeck, B., T. Kyndt, E. Romeijn-Peeters, W. Van Thuyne, P. Goetghebeur, J. P. Romero-Motochi, y G. Gheysen. 2006. Evidence of natural hybridization and introgression between *Vasconcellea* species (*Caricaceae*) from Southern Ecuador revealed by chloroplast, mitochondrial and DNA markers. *Ann. Bot.* 97: 793-805.
- Welsh, J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Xu, D. H. y J. Y. Gai. 2003. Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis. *Plant Breeding.* 122: 503-506.
- Yamagishi, M. 1995. Detection of section - specific markers random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl. Genet.* 91: 830-835.
- Yeh, S., D. Gonsalves, H. Wang, R. Namba y R. Chiu. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Phytopathology.* 74: 1086-1091.





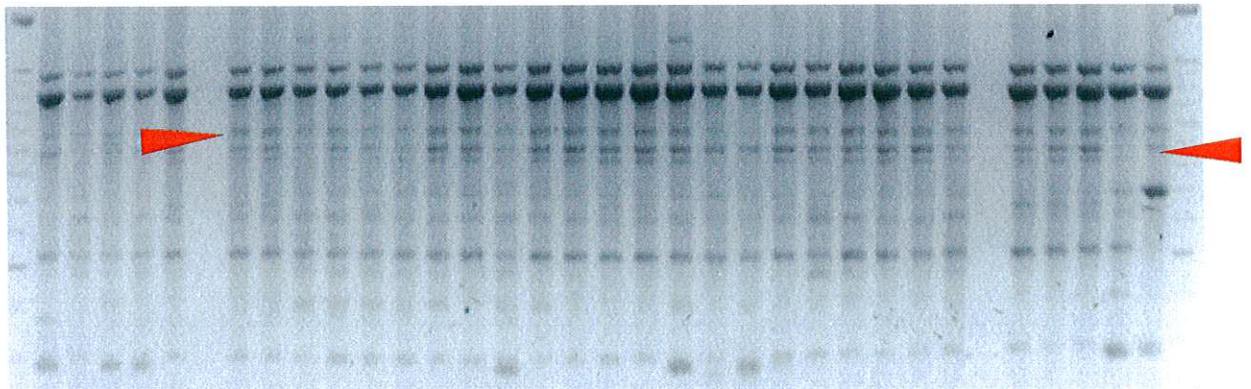
## Anexo 2. Fotografías de los Geles con los distintos Iniciadores



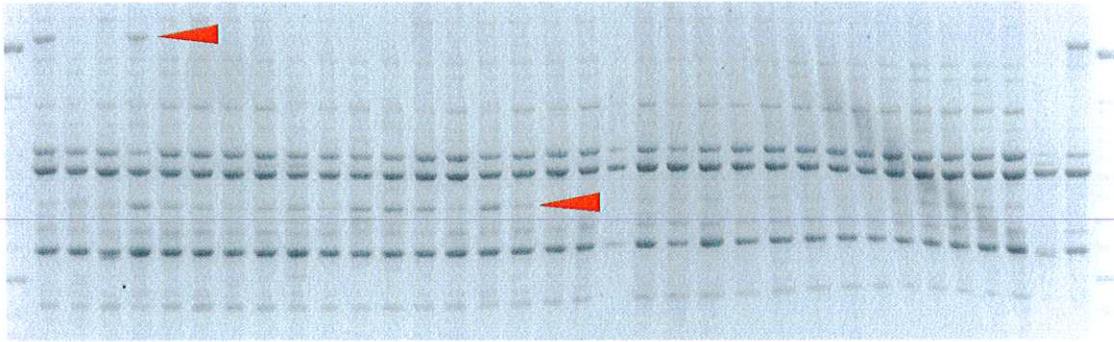
Iniciador 1



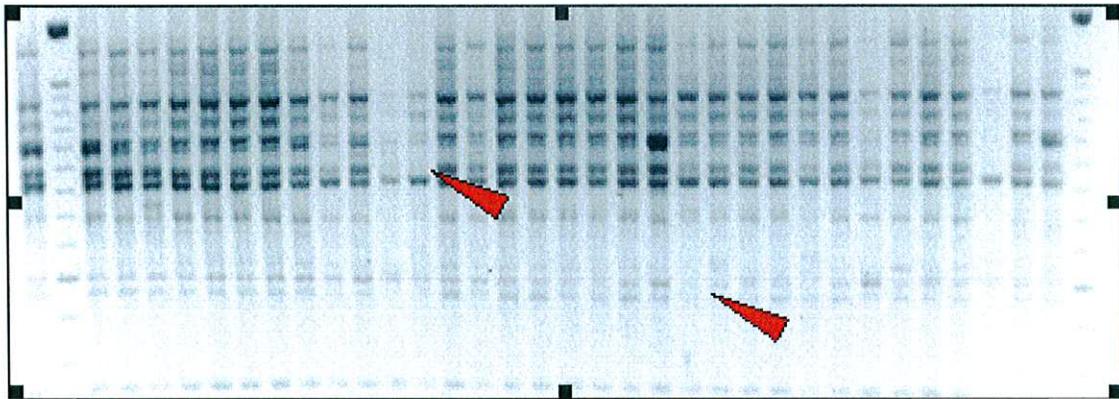
Iniciador 2



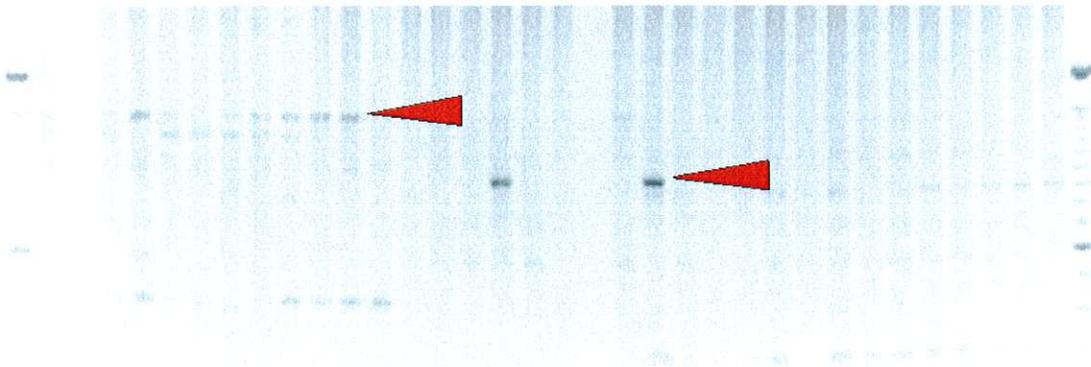
Iniciador 3



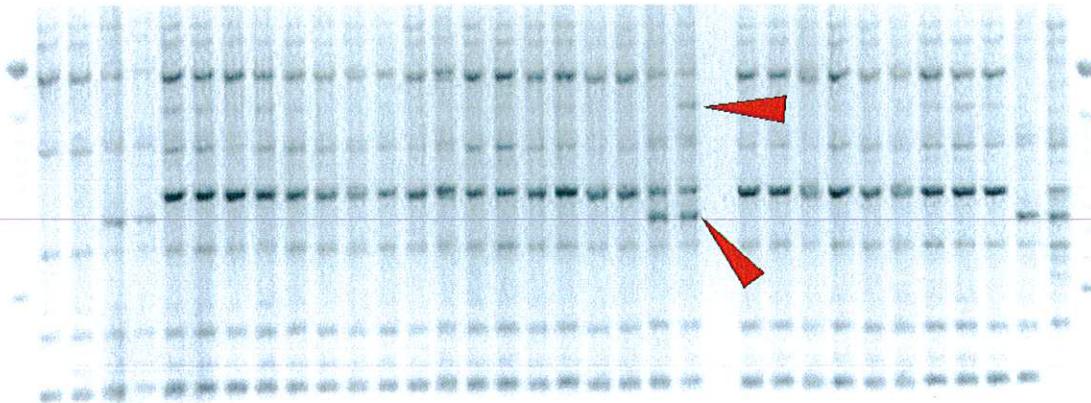
Iniciador 4



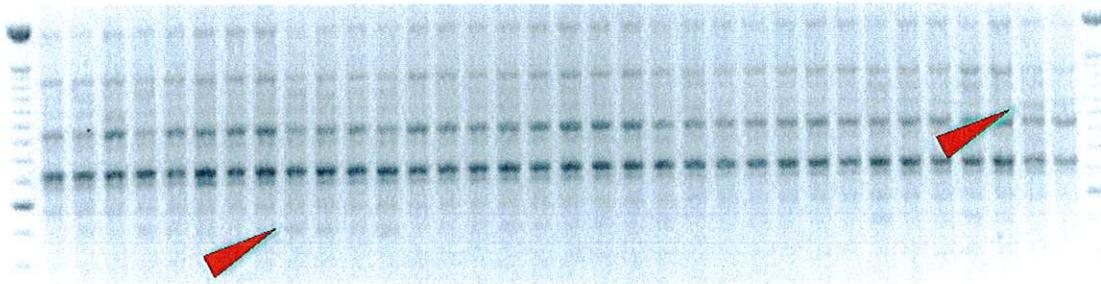
Iniciador 5



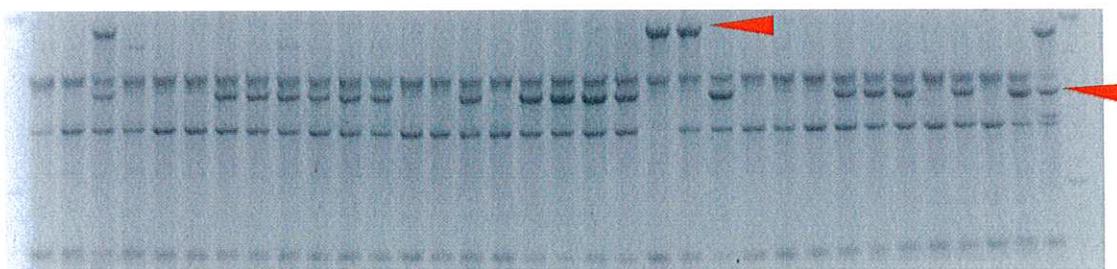
Iniciador 6



Iniciador 7



Iniciador 8



Iniciador 9