

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE  
GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis de la variabilidad genética de la papaya maradol (*Carica papaya* L.) en los departamentos de Escuintla y Retalhuleu, Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares

Sebastián Enrique Yurrita De la fuente

Guatemala  
2009



Análisis de la variabilidad genética de la papaya Maradol (*Carica papaya* L.) en los departamentos de Escuintla y Retalhuleu, Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE  
GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Análisis de la variabilidad genética de la papaya Maradol (*Carica  
papaya* L.) en los departamentos de Escuintla y Retalhuleu,  
Guatemala mediante el uso de marcadores moleculares

Trabajo de investigación presentado por  
Sebastián Enrique Yurrita De la fuente  
para optar al grado académico de  
Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2009

Vo.Bo.:

(f)   
Licenciada Margarita Palmieri

Tribunal:

(f)   
Licenciada Margarita Palmieri

(f)   
Pamela Pennington Ph.D

(f)   
Licenciado Andrés Ávalos

Fecha de aprobación del examen: Guatemala, 09 de junio del 2009

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco especialmente a Dios, mis padres y hermana por haber estado conmigo desde antes del inicio y aún después del final.

A la Licenciada Margarita Palmieri por su colaboración, confianza y consejo para poder llevar a cabo esta investigación.

Al Licenciado Andrés Ávalos y Mishel Steaphenson por haberme involucrado en un proyecto en extremo interesante. Además por su ayuda, consejo y amistad en todo momento.

A la Doctora Pamela Pennington por su amplia visión y conocimiento al momento de hacer una investigación.

A la Doctora Maselli que con sus conocimientos, dio el último empujón para finalizar esta tesis.

A Carolina Argueta, porque su ayuda, consejo y colaboración se extiende más allá de estas páginas.

A Laura Grajeda por auxiliarme en el momento justo, en que tropecé con la primera piedra en el camino.

A Melany Velásquez por su confianza incondicional y su mano amiga que en todo momento buscó ayudarme.

A Thomas Peña por su amistad, apoyo, consejo y ayuda en todo momento, aun fuera del laboratorio.

Y a todas las personas que no menciono, pero que sin los cuales jamás hubieran podido plantarse los cimientos de este Trabajo de Graduación.

# CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. ANTECEDENTES.....	2
1. El papayo.....	2
2. Siembra y cultivo de la papaya.....	4
3. Genética de la papaya.....	5
4. Variedades de papaya.....	5
5. Papaya Maradol.....	6
6. Semillas certificadas de la variedad Maradol.....	6
7. Vigor híbrido de la variedad Maradol.....	7
8. Mercado de la Papaya.....	8
9. Marcadores moleculares.....	11
10. Secuencias simples repetidas.....	13
a. Características de los microsatélites.....	15
b. Clasificación de los microsatpélites.....	15
c. Ventajas del uso de los microsatélites.....	16
d. Limitaciones de los microsatélites.....	16
e. Aplicaciones de los microsatélites.....	17
f. Iniciadores utilizados para la amplificación de los microsatélites.....	17
11. Secuencias simples interrepetidas.....	18
a. Ventajas y desventajas en la utilización de ISSR.....	20
b. Iniciadores utilizados para la determinación de ISSR.....	20
12. Genética de poblaciones.....	21
a. Frecuencia alélica de poblaciones.....	21
b. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	21
c. Heterozigosidad.....	21
d. Árboles filogenéticos.....	22
B. Objetivos.....	22
1. General.....	22
2. Específico.....	22
C. Hipótesis.....	23

II. METODOLOGIA.....	24
A. Colecta de muestra.....	24
B. Extracción de material genético.....	25
C. Verificación de la integridad de ADN.....	26
D. Cuantificación y determinación de la pureza del ADN extraído.....	28
E. Determinación de la diversidad por ISSR.....	29
1. Amplificación de SSR.....	29
2. Preparación de geles.....	30
3. reparación de cristales o placas de vidrio.....	31
4. Preparación del gel de poliacrilamida.....	32
5. Pre-corrída de gel.....	33
6. Preparación de muestras de ADN.....	33
7. Carga de las muestras en el gel.....	34
8. Corrida de gel.....	34
9. Post-corrída del gel.....	34
10. Tinción del gel con nitrato de plata.....	34
F. Amplificación de secuencias simples interrepetidas.....	36
1. Amplificación de ISSR.....	36
G. Análisis de resultados.....	37
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
IV. CONCLUSIONES.....	51
V. RECOMENDACIONES.....	52
VI. REFERENCIAS.....	53
VII. ANEXO.....	61

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica del papayo.....	2
3. Listado de los principales países exportadores de papaya en el mundo.....	9
4. Detalle de las plantaciones de papaya establecidas y la generación de jornales de los años 2006 y 2007, según los datos del ministerio de agricultura, ganadería y alimentación (MAGA) y el proyecto de desarrollo de la fruticultura y agroindustria (PROFRUTA) de Guatemala.....	10
2. Comparación de las características de cuatro tipos de marcadores moleculares.....	13
5. Tipos y ejemplos de microsátélites.....	17
6. Secuencias de iniciadores utilizados para la amplificación de microsátélites en papaya.....	18
7. Secuencias de los iniciadores para la amplificación de intermicrosátélites..	21
8. Forma de muestreo de árboles de papaya.....	24
9. Soluciones y materiales utilizados para la verificación de la integridad del ADN.....	26
10. Soluciones y materiales utilizados para la cuantificación y determinación de pureza del ADN extraído por muestra.....	28
11. Programa de amplificación de PCR para SSR de papaya.....	30
12. Preparación de la solución de Bind silane.....	31
13. Nombre de los reactivos y sus respectivas cantidades utilizadas en la elaboración del gel de acrilamida.....	32

14.	Preparación solución de ácido acético al 10%.....	34
15.	Preparación de la solución de nitrato de plata.....	35
16.	Preparación de la solución de carbonato de sodio.....	35
17.	Programa de PCR para la amplificación de ISSR.....	37
18.	Absorbancias a 260, 280 y 320 nm, razón A260/A280 y concentración de muestras obtenidas a partir del método de extracción de ADN.....	60
19.	Programas de PCR utilizados para la amplificación de SSR en papaya.....	62
20.	Protocolos de PCR con distintas concentraciones finales de reactivos para la amplificación de SSR.....	63
21.	Cantidad y longitud de bandas obtenidas tras amplificación por tipo de microsatélite.....	65
22.	Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP1, en el departamento de Escuintla.....	76
23.	Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP2, en el departamento de Escuintla.....	77
24.	Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP1, en el departamento de Retalhuleu.....	79
25.	Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP2, en el departamento de Retalhuleu.....	80
26.	Lista de las heterocigosidades observadas y esperadas de cada una de las regiones evaluadas.....	81
27.	Lista de heterocigosidades esperadas y observadas de cada una de las generaciones filiales por en cada una de las poblaciones.....	82

28.	Valores de Chi cuadrado y valores P para observar equilibrio de Hardy Weinberg dentro de las poblaciones de Escuintla y Retalhuleu.....	83
29.	Índices de similitud de las muestras de Escuintla amplificadas con el iniciador IPM1.....	84
30.	Índices de similitud de las muestras de Escuintla amplificadas con el iniciador IPM2.....	85
31.	Índices de similitud promedio de las muestras F1 y F2 de cada uno de los departamentos e iniciadores muestreados.....	86
32.	Valores de los índices de fijación total de la población (Fst) de las muestras F1 y F2 de papaya maradol.....	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fotografía del papayo, sus hojas, flores y fruto.....	3
2. Diagrama en el que se muestra una región microsatélite, delimitada por dos regiones, con las cuales es factible diseñar los iniciadores.....	14
3. Amplificación de una secuencia intermicrosatélite, realizada por un iniciador (CA) <sub>N</sub> anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras. Amplificación del segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélites en orientación invertida.....	20
4. Mapa de Guatemala donde se muestra la locación del municipio de Escuintla y Retalhuleu.....	25
5. Diseño de los cristales A y B de la cámara de electroforesis.....	33
6. Patrón de corrida electroforética de muestras de ADN de papaya; en gel de agarosa al 1%.....	39
7. Gel de secuenciación donde se muestra la amplificación de una muestra de papaya maradol F2 y F1 con el iniciador PM1, PM2 y PM3.....	66
8. Gel de secuenciación donde se muestra la amplificación de una muestra de papaya maradol F2 y F1 y muestras de papaya hawaiana, con el iniciador PM4, PM5.....	67
9. Gel de secuenciación microsatélite PM1, de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2.....	68
10. Gel de secuenciación microsatélite PM3 de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2.....	69
11. Gel de secuenciación microsatélite PM5, de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2.....	70

12.	Gel de secuenciación microsatélite PM6, de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2.....	71
13.	Gel de secuenciación microsatélite PM3, de las muestras de Retalhuleu, Papaya Maradol F1 y F2.....	73
14.	Gel de secuenciación intermicrosatélite IMP2 de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2.....	74
15.	Esquema de la escalera Promega de 50pb.....	75
16.	Grado de confianza de los índices de similitud. En el eje X se muestra el número de mediciones, y en el eje Y el valor promedio con su desviación estándar de los índices de similitud.....	87
17.	Dendrograma basado en Neighbor joining de las muestras de Escuintla, utilizando el iniciador IPM1.....	89
18.	Dendrograma basado en Neighbor joining de las muestras de Escuintla, utilizando el iniciador IPM2.....	90
19.	Dendrograma basado en Neighbor joining de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM1.....	91
20.	Dendrograma basado en Neighbor joining de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM2.....	92
21.	Dendrograma basado en el análisis por agrupamiento UPGMA de las muestras de Escuintla, utilizando el iniciador IPM1.....	93
22.	Dendrograma basado en el análisis por agrupamiento UPGMA de las muestras de Escuintla, utilizando el iniciador IPM2.....	94
23.	Dendrograma basado en el análisis por agrupamiento UPGMA de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM1.....	95
24.	Dendrograma con UPGMA de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM2.....	96

## RESUMEN

La Papaya (*Carica papaya* L.) es un árbol tropical frutal de gran relevancia económica mundial. La planta entera produce una enzima proteolítica llamada papaína, la cual se utiliza como suavizante de carne, clarificador de cerveza entre otras posibles aplicaciones médicas. La papaya es oriunda de Centro América, y es la única especie del género *Carica*.

Aun cuando su comercio mundial ha ido en aumento en los últimos años, muy poca importancia se ha puesto en tratar de caracterizarla. Recientes estudios, tales como el Proyecto del Genoma de la Papaya, han aportado una serie de secuencias microsátélites de esta planta. En este trabajo se evalúan seis de esas secuencias microsátélites con el fin de evaluar su grado de polimorfismo entre dos generaciones filiales de papaya maradol. Este estudio muestra que las seis secuencias microsátélites antes mencionados, no son marcadores polimórficos para la papaya maradol.

Los resultados obtenidos del análisis de las huellas digitales obtenidas de la amplificación por las dos secuencias intermicrosátélites, muestra un alto grado de heterocigosidad de la generación F1 y F2. Esto demuestra tras el análisis de los dendrogramas obtenidos, una selección de ciertos genes de la F1, que son transmitidos a la F2; aumentando de esta manera la brecha de variabilidad genética entre ambas generaciones.

Se respalda de esta manera que muy probablemente las semillas obtenidas de otras certificadas, no mantienen las características moleculares de sus predecesoras en su totalidad; y que el uso de éstas (semillas no certificadas) proporciona frutos y características morfológicas del árbol, dudosas, como productos de papaya maradol.

Se recomienda la continuación del análisis de las secuencias microsátélites restantes, con el fin de encontrar marcadores moleculares eficientes para medir el polimorfismo en este cultivo.

A su vez se insta a continuar analizando las posteriores generaciones filiales de la papaya maradol, con el fin de estimar los cambios subsecuentes en la heterocigosidad.

## ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L.) is a tropical fruit tree of great economic importance worldwide. The whole plant produces a proteolytic enzyme called papain, which is used as a softening of meat, beer clarifier among other possible medical applications. The papaya is native to Central America, and is the only species of the genus *Carica*.

While world trade has grown in recent years, very little importance has been placed on trying to characterize it. Recent studies, such as the Papaya Genome Project, have made a series of microsatellite sequences from this plant. In this paper we evaluated six of these microsatellite sequences in order to assess their degree of polymorphism between two generations of papaya maradol. This study shows that the six microsatellite sequences mentioned above are not polymorphic markers for papaya maradol.

The results of the analysis of the fingerprints obtained by amplification of the two sintermicrosatellites sequences show a high degree of heterozygosity of the F1 and F2 generations. This analysis of the dendrograms obtained, shows a selection of certain genes of the F1, which are transmitted to the F2, thus increasing the gap between genetic variability of both generations

It is recommended the continuation of the analysis of the remaining microsatellite sequences in order to find molecular markers to measure effective polymorphism in this crop.

This in turn encourages further assess of the next generations of papaya maradol, to estimate the subsequeute heterozigosity variation.

# I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papaya en Guatemala es de gran importancia, como producto agrícola no tradicional de exportación. El cultivo a escala mundial va en incremento en su popularidad y demanda, tanto como fruta para consumo humano, como por las enzimas que se pueden extraer de él.

Existen muchas variedades de papaya, entre ellas la papaya Maradol que se caracteriza por su sabor singular, tamaño y productividad. Esta papaya se cultiva a partir de semilla certificada, debido a que se trata de una planta híbrida diseñada científicamente. Una planta híbrida es aquella en la cual se han mezclado características genéticas de distintos congéneres. Estas características se seleccionan por medio de métodos tradicionales, tales como la selección de genes por fenotipos deseados. De esta manera solamente las plantas que cumplan los requisitos visuales, tendrán oportunidad del apareamiento.

Cada día, los productores del cultivo se ven en la necesidad de afrontar la rentabilidad de la cosecha. Esto es en parte debido a que el vigor híbrido de la papaya se pierde con el paso del tiempo, al pasar de generación en generación, por causa de entrecruzamientos entre organismos relacionados. Es así como las plantas Maradol preseleccionadas comienzan a manifestar características propias de sus antecesores y no de las mezclas deseadas.

La importancia de este estudio radica en el hecho de analizar molecularmente la variabilidad genética que ocurre de la primera a la segunda generación filial de papaya, cuando no se utilizan por segunda vez semillas certificadas. De esta manera se analiza la posibilidad de disminuir el consumo de semillas certificadas, debido a que no se pierde información genética importante hasta la segunda generación de la papaya Maradol.

## A. ANTECEDENTES

1. El papayo. El papayo (*Carica papaya*) es un arbusto perteneciente a la familia *Caricaceae*. Es una planta de origen americano, conocida y empleada en toda América desde hace varios siglos.

Actualmente figuran 21 especies pertenecientes al género *Carica*; aun así, *Carica papaya* es la especie de mayor importancia económica. (Tung *et al.* 2003).

La clasificación taxonómica del papayo se muestra en el Cuadro 1.

CUADRO 1: Clasificación taxonómica del papayo.

<b>Dominio</b>	<b>Eukaria</b>
<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Antophyta
<b>Subdivisión</b>	Angiosperma
<b>Clase</b>	Dicoteledónea
<b>Subclase</b>	Chrisopétala
<b>Orden</b>	Apriétales
<b>Familia</b>	Caricacea
<b>Género</b>	Carica
<b>Especie</b>	<i>Carica papaya</i>

(Ibar 1986) (Tung *et al.* 2003)

La planta posee un tronco hueco sin ramas (a pesar de lo que podría inferirse de la imagen incluida en la clasificación científica), de una altura entre 1,8 y 6 m, coronado por follaje en forma palmeada, provisto de largos pecíolos (ver Figura 1). El mismo conserva aún en los especímenes maduros una textura succulenta y turgente, escasamente leñosa; y presenta numerosas cicatrices características, producto del crecimiento y caída consecutiva del follaje superior. El arbusto presenta una raíz principal pivotante que puede desarrollarse hasta un metro de profundidad. Las raíces secundarias se concentran

en un radio de 80 cm y la mayor concentración de raíces absorbentes se encuentra en los primeros 20 cm de la superficie del suelo.

Las hojas de tipo palmeadas poseen largos pedúnculos y lóbulos, midiendo las hojas hasta 24 cm de diámetro y los tallos alrededor de 61 cm de largo. Éstas están dispuestas a lo largo del tallo en forma alterna. La planta produce un promedio de 2 hojas por semana, desarrollando en un año hasta 100 hojas nuevas. Una planta adulta posee alrededor de 30 hojas funcionales, y se considera que el mínimo de hojas con las cuales puede desarrollarse bien es de 15. (Tung *et al.* 2003)

Figura 1: Fotografía del papayo, sus hojas, flores y fruto.



(Yurrita 2008)

La papaya es el fruto del papayo. Este fruto es rico en vitamina A, B1, B2, y ácido ascórbico. Además de consumirse como fruta fresca el látex obtenido de la papaya contiene papaína. La papaína es una enzima con numerosas aplicaciones en la industria de la alimentación (como clarificador de cerveza y como ablandador de carne, cosmética y farmacéutica.) (Ibar, 1986)

El papayo es un árbol que posee los sexos separados. Incluso, las flores masculinas y femeninas se encuentran en distinto pie de la planta; por lo que se le considera una planta dioica. Sin embargo, algunas veces las flores masculinas y femeninas están en el mismo

pie, por lo que la planta es monoica. Si existen flores masculinas, femeninas y hermafroditas, entonces la planta es polígama. (Mora y Bogantes; 2005) (Hao *et al.*, 2004)

2. Siembra y cultivo de la papaya. La práctica más común de propagación de la papaya es por medio de semilla. En la mayoría de los casos, y debido a que la variedad Maradol es un híbrido, suelen utilizarse semillas certificadas. El uso de semillas requiere de la utilización de semilleros, donde se desarrollan las plántulas. En algunos lugares las siembras se hacen directamente en el campo, usando un promedio de 20 semillas por postura.

Existen otros métodos de propagación de semilla, entre los cuales se encuentran los métodos asexuales. En ellos se desarrolla la plántula a partir de cultivo de tejidos usando yemas laterales y posteriormente los meristemos aislados, o por medio de propagación por estacas, injertos y raíces. Con respecto a la propagación por medio de cultivo de tejidos, se ha visto que se puede llegar a obtener un 100% de hermafroditismo. (Escobar 2000)

Durante el proceso de crecimiento del cultivo es necesario realizar un raleo previo, en donde los brotes laterales del tallo principal del arbusto son removidos; esto se debe a que estos tallos axiales tienden a producir frutos que suelen ser de mucho menor tamaño. Otra práctica común es el deshoje, en el cual las hojas más viejas de las plantas deben ser eliminadas ya que pueden convertirse en hospederos de varias plagas y enfermedades, tales como el virus del anillado de la papaya (PRSV-p). (Escobar 2000)

Una vez las plantas de papaya han madurado y empiezan a producir flor, es posible realizar un sexado. En esta práctica, los productores buscan seleccionar mediante características morfológicas de las flores, el sexo de las mismas. De esta manera se seleccionan las plantas hermafroditas y las hembras, en tanto que las plantas macho son eliminadas. Esto tiene como fin tratar de aumentar el porcentaje de plantas hermafroditas que aseguren una producción predominantemente de frutos alargados. (Escobar 2000)

3. Genética de la papaya. El papayo es una planta dioica con herencia diploide. Basado en esta relación de segregación sexual, Horovitz y Jiménez (1967) consideran que la papaya tiene un sistema de determinación sexual de tipo cromosómico XY. La combinación cromosómica XX determina el fenotipo femenino y XY determina el tipo masculino.

Recientemente se ha confirmado que la papaya presenta un cromosoma Y evolutivamente incipiente que contiene un pequeño sector no recombinante (Ma *et al.* 2004), el cual agrupa los genes que codifican para sus caracteres sexuales masculinos (Liu *et al.* 2004).

Se postula que dicha región también comprendería un gen vital mutado e inactivo para el desarrollo del embrión, por lo cual los genotipos homocigotos dominantes serían letales (Liu *et al.*, 2004). El resto del cromosoma Y es de características autosómicas.

Actualmente se conoce que el genoma de la papaya está compuesto por 372 millones de pares de bases, contenidos en nueve cromosomas. (Universidad de Hawaii en Manoa 2008).

4. Variedades de papayos. Debido a que el papayo se reproduce generalmente por semillas, son muchas las variedades conocidas y continuamente aparecen otras nuevas (Tung *et al.* 2003).

En cada zona de cultivo existen variedades propias mejor adaptadas a sus condiciones climatológicas. Sin embargo, las variedades mestizas son poco estables, por lo que es preciso tener cuidado en obtener semillas cuyos progenitores pertenezcan a la misma variedad (Hao *et al.* 2004).

Factores como la complejidad de sexos, múltiples combinaciones florales, facilidad de cruzamiento por viento o insectos, hacen difícil mantener la pureza de las distintas variedades. Esto hace que una variedad pierda su identidad en dos o tres generaciones, sin

embargo se puede evitar que esto suceda mediante polinización controlada. Para ello se puede lograr mayor homogeneidad usando variedades que posean solamente flores hermafroditas; o desarrollar mediante investigación algún método de reproducción asexual, que mantenga las características deseables de la variedad (Hao *et al.*, 2004)

Actualmente, son muy conocidas en el mundo, las variedades Solo (Hawaiana), Bluestem, Maradol, Graham, Betty, Fairchild, Rissimee, Puna y Hortusged. En Guatemala se encuentran y comercializan las variedades hawaiana taynun y maradol (Tung *et al.* 2003).

Las diferencias entre las tres principales plantas de papaya en Guatemala, son bastante bien marcadas desde un punto de vista fenotípico. Estas diferencias se manifiestan únicamente cuando la planta empieza a florear o en la producción del fruto. (Tung *et al.* 2003).

5. Papaya Maradol. La variedad maradol es de origen cubano. El árbol es de porte relativamente bajo y los frutos son de tamaño mediano (2.8 kg). A su vez, los frutos presentan la ventaja que poseen tanto la pulpa como su cáscara muy firme, lo que la hace bastante resistente al transporte. Además su forma es generalmente alargada, facilitando su empaque. Las plantas de esta variedad, tienen una proporción de 67% de hermafroditismo y 33% de flores femeninas. (Mora y Bogantes 2005).

La papaya Maradol se destaca por su buen sabor y alto valor nutricional. La buena duración en pos cosecha, su resistencia al transporte en largas distancias, y la alta productividad del cultivo (180 toneladas por hectárea al año) le confieren un lugar estable en el mercado presente y futuro. (Tung *et al.* 2003).

6. Semillas certificadas de la variedad Maradol. La propagación de las distintas semillas de cada variedad suele realizarse mediante semilla importada. Estas semillas suelen ser certificadas. Este proceso suele ser bastante costoso tanto por la adquisición de las semillas, como por el largo proceso llevado a cabo para su preparación

antes de pasar al campo de siembra; aún así, algunos agricultores continúan haciendo uso de él. El alto costo de este proceso ha generado que muchos de los agricultores en Guatemala continúen sus cosechas mediante el uso de semillas obtenidas de la siembra anterior, provocando una posible variabilidad genética entre las plantas de la misma variedad. (Tung *et al.* 2003).

En Guatemala la producción de papaya se centra a dos regiones únicamente: la región sur (Retalhuleu y Escuintla), región oriental y la norte (Petén), en mucha menor cantidad. Aunque solamente en la región sur del país se siembra la variedad maradol. (Tung *et al.*,2003) (MAGA, 2008)

La semilla certificada tiene un 66% de plantas hermafroditas y un 33% de hembras. Los agricultores tienden a aumentar estas proporciones al sembrar el doble o en algunos casos hasta el tripe de semillas certificadas. Esto permite que aumenten el porcentaje de hermafroditismo a un 85 y 93% respectivamente. (Tung *et al.* 2003)

Esta práctica genera un problema, se aumenta el grado de hermafroditismo al mismo tiempo que, se incrementa el grado de hembraesterilidad. Este es un mecanismo natural, en el cual se asegura la supervivencia de la especie, al tratar de aumentar las posibilidades de intercambio genético entre dos plantas de papaya distintas. (Tung *et al.* 2003)

7. Vigor híbrido de la variedad Maradol. El vigor híbrido o heterosis es el fenómeno en donde los híbridos o generación F1 obtenida a partir de varias plantas, exhiben fenotipos superiores a los de sus padres. Esta técnica permite obtener variedades superiores tanto en calidad, como en productividad. Este tipo de hibridización entre papayas permite especiación, evolución adaptativa e innovaciones ecológicas (Zhuang *et al.* 2007).

La papaya Maradol es un híbrido diseñado por un laboratorio cubano. En ella se busca fomentar las mejores características de sus padres.

El vigor híbrido se mantiene conservando constantemente un reservorio de semillas certificadas de esta variedad. De esta manera se descartan las plantas de la cosecha anterior, y se sustituyen por nuevas plantas, obtenidas de un nuevo lote de semillas certificadas (Stupar *et al.* 2008).

Al realizar la cruce entre dos organismos, sin importar el número de ellos, el producto F1 posea un máximo vigor híbrido. Al cruzar la F1 entre sí, para obtener la segunda generación, o F2, se disipa una porción del vigor inicial. Esta reducción del vigor híbrido entre F1 y F2 depende del número de variedades o razas que integran la mezcla. Y, entre mayor es el número de razas que integran la mezcla, mayor es la retención del vigor híbrido (Stupar *et al.* 2008). Debido a que la composición de la F1 con respecto a la de los padres puede variar drásticamente, es oportuno mencionar que la disipación de genes de una generación a la siguiente, pueda variar de igual manera. La composición de la generación F2, variaría en un 50% (con el mismo porcentaje de reducción del vigor híbrido), generando variaciones aleatorias en el resto del genoma (Balestre *et al.* 2008).

8. Mercado de la papaya. La papaya es una de las frutas tropicales con mayor potencial que se producen a nivel mundial. Los mercados de papaya han mostrado un continuo y estable crecimiento, y muchos importadores están optimistas con respecto al futuro de este producto, la clave del éxito para la papaya en el futuro son los desarrollos en cuanto a variedades, avances en el manejo del cultivo además del desarrollo de tecnologías para el transporte y el manejo post cosecha (MAGA 2008).

En el año 2000 la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura de la Organización de las Naciones Unidas reportó un estimado de 5.1 millones de toneladas métricas cosechadas a nivel mundial, esto casi duplica la producción del año 1980 (FAO 2007).

Los mercados actuales de papaya en el mundo han aumentado considerablemente. Y aunque países como Brazil y México exportan una gran cantidad de papaya al extranjero; la demanda por este producto no llega a saciarse por completo (FAO 2007).

Actualmente nuevos mercados como el europeo, asiático e incluso el estado unidense han incrementado su importe y exporte tanto de frutas como vegetales. La papaya no ha sido la excepción, la cual, como se observa en el Cuadro 2 mantiene un alto nivel de exportación en toneladas métricas, en especial por países de América. Pronto este mercado se ampliará para países como Holanda, Alemania y Bélgica. Registros indican que durante los años 2003 y 2004, el mercado Europeo compró un 62% de la producción total mundial de productos no tradicionales como la papaya. Esto se tradujo a US\$31.9 millones invertidos en este tipo de productos; generando ganancias para 1,056 productores aproximadamente. Este valor fue US\$5.7 millones mayor que en años anteriores (FAO 2007).

CUADRO 2 : Listado de los principales países exportadores de papaya en el mundo.

<b>País exportador</b>	<b>Toneladas métricas de papaya en general</b>
<b>México</b>	59,638
<b>Malasia</b>	34,312
<b>Brasil</b>	9,878
<b>Estados Unidos</b>	6,024
<b>Jamaica</b>	4,000
<b>Holanda</b>	2,051
<b>Guatemala</b>	1,467
<b>Costa Rica</b>	1,000
<b>Ghana</b>	1,000

(FAO 2007).

El mercado de actual de los países que exportan papaya en Latinoamérica está altamente influenciado por la exportación de la variedad maradol. Este hecho se puede observar en el Cuadro 2, donde se muestra el volumen de producción de papaya (en toneladas). A su vez, en el Cuadro 3 se muestran las principales variedades producidas en Guatemala, junto a la generación anual de jornales que se manifiesta en la siembra de papaya. (FAO 2007)

CUADRO 3: Detalle de las plantaciones de papaya establecidas y la generación de jornales de los años 2006 y 2007, según el MAGA y PROFRUTA

Departamento	Variedad	Hectáreas establecidas	Cantidad de plantas otorgadas	Monto asignado (Q.)	GENERACIÓN DE JORNALES ANUALES	
					2006	2007
<b>Escuintla</b>	Criolla	60.530	131,148.00	491,805.00	31,983	<b>34,172</b>
	Maradol	31.100	91,366.00	180,777.88	9,638	<b>11,750</b>
	Subtotal	94.630	222,514	671,582.88	41,621	<b>45,922</b>
<b>Quetzaltenango</b>	Criollas	21.903	50,157	188,088.75	11,573	<b>12,365</b>
	Subtotal	21.903	50,157	188,088.75	11,573	<b>12,365</b>
<b>Retalhuleu</b>	Criolla	46.955	106,350	398,812.50	24,810	<b>26,508</b>
	Maradol	17.730	82,004	178,768.72	9,368	<b>10,009</b>
	Tainung	11.200	44,800	97,664.00	5,918	<b>6,323</b>
	Subtotal	75.885	233,154	675,245.22	40,096	<b>42,840</b>

Guatemala es uno de los países que mediante el renovado impulso por parte de sectores privados, han promovido la producción y exportación de productos agrícolas no tradicionales. Entre estos se encuentran la papaya, la mora y el mango, entre otros.

Esto se ve reforzado, mediante el hecho que tanto el clima como el suelo de Guatemala son ideales para el cultivo de la papaya (clima tropical, suelo con pH entre 6 y 7 y una humedad relativa del 70%) (Tung *et al.* 2003), (MAGA 2008).

9. Marcadores moleculares. La caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y agronómicos. Actualmente se han desarrollado técnicas que permiten la caracterización de una planta como la papaya, mediante el uso de marcadores moleculares (marcadores de ADN o ácido desoxirribonucleico) (Azofeifa-Delgado 2006).

Existen dos clases de marcadores, los morfológicos y los moleculares. Los marcadores morfológicos han sido muy útiles, pero presentan muchas limitantes. Esto se debe a que la expresión de algunos caracteres están sujetos a factores ambientales o fenológicos. Con frecuencia, este tipo de marcadores sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta, cuando ésta llega a su estado adulto, en donde para la gran mayoría de frutales tropicales significa una espera, no deseable, de varios años (Azofeifa-Delgado 2006)

Por otro lado, los marcadores moleculares, gracias a los avances en la biología molecular, se han implementado como métodos de identificación y caracterización; que superan en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, y pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas. Además son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, y permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres. Es importante mencionar que están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa-Delgado 2006).

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia notípica controlada genéticamente. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (IAEA 2002).

Actualmente los marcadores moleculares se emplean para la caracterización genética y para el mejoramiento genético de muchos cultivos. Esto permite determinar la

biodiversidad de los cultivos y reconstruir relaciones filogenéticas de los mismos o bien, la de sus patógenos. (Shen, *et al.* 2006).

Algunos ejemplos de las técnicas que utilizan marcadores moleculares son: Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), secuencias simples inter repetidas (ISSR), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), entre otros (IAEA 2002).

En el Cuadro 4 se presenta el resumen de las principales características de los marcadores moleculares antes mencionados (Gupta *et al.* 2007) (Azofeifa-Delgado 2006).

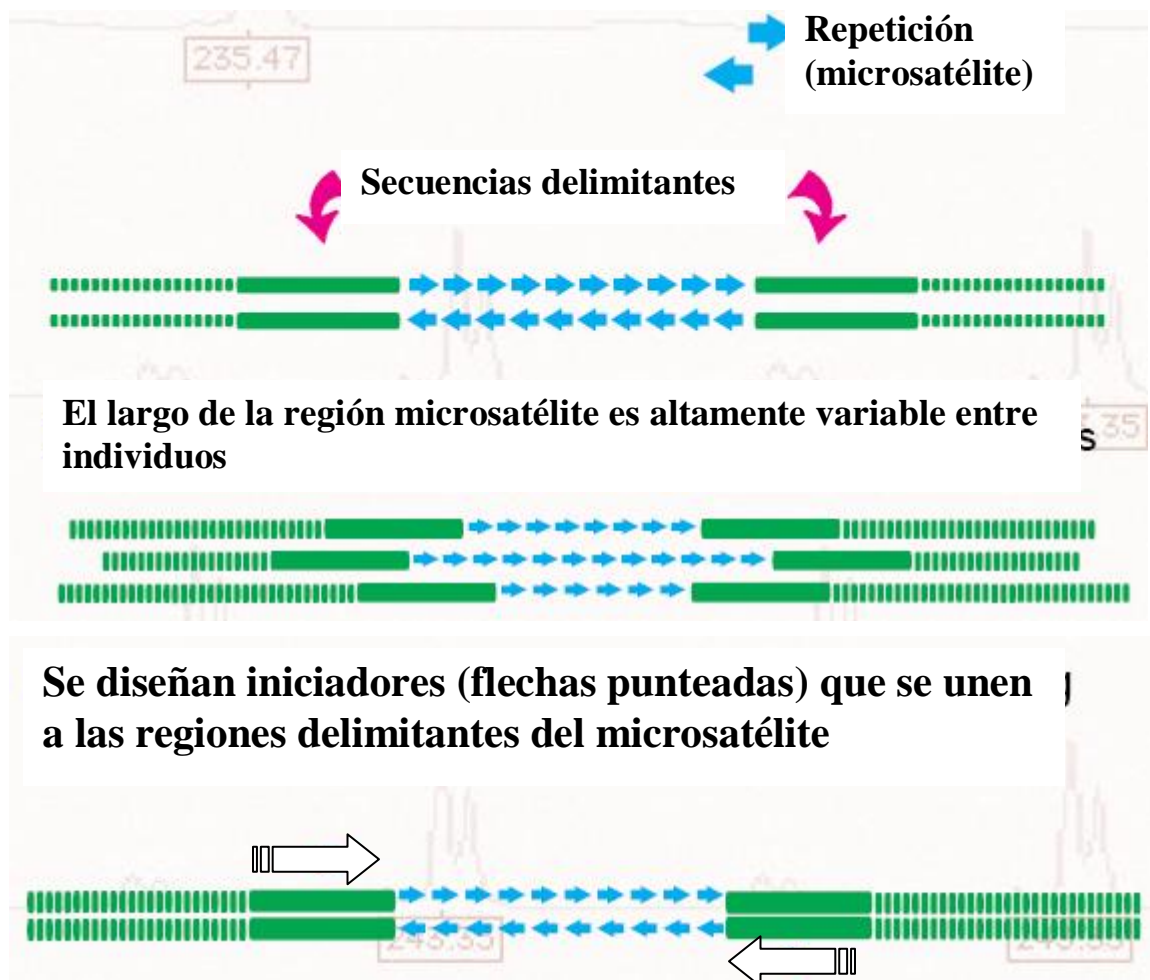
CUADRO 4: Comparación de las características de cuatro tipos de marcadores moleculares

<b>Característica</b>	<b>SSR</b>	<b>AFLP</b>	<b>ISSR</b>	<b>RAPD</b>
<b>Nivel de polimorfismo que detecta</b>	Alto	Medio	Alto	Medio
<b>Tipo de dominancia</b>	Codominante	Codominante / dominante	Codominante / dominante	Dominante
<b>Número de loci</b>	Multiloci	Multiloci	Multiloci	Multiloci
<b>Abundancia en el genoma</b>	Media	Alta	Media	Muy alta

(Azofeifa-Delgado 2006).

10. **Secuencias Simples Repetidas (SSR).** Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, tal como se observa en la figura 2, y distribuidas aleatoriamente en los genomas de los organismos. Además son secuencias de ADN altamente variables; presentes en los genomas de hongos, plantas y animales (Suresh *et al.* 2007). Estas secuencias pueden o no estar asociadas con genes; por lo que son *loci* altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma (Muduniri y Nagarajaram 2007).

FIGURA 2: Diagrama en el que se muestra una región microsatélite, delimitada por dos regiones, con las cuales es factible diseñar los iniciadores.



(Azofeifa-Delgado 2006).

Se sabe además que la repetición microsatélite por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y que debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, mantienen un alto grado de variabilidad polimórfica. Esto genera que estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Azofeifa-Delgado 2006) (Suresh *et al.* 2007).

Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como

iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (Mackay, Wright y Bongfiglioli 2008). El origen de tal polimorfismo está aún en debate, aunque previsiblemente éste se deba al evento de “resbalón” o “slipagge” durante la replicación del DNA (Schlotterer y Tautz 1992; Zane *et al.* 2002), en el cual ya sea la cadena nueva o la cadena patrón se desliza sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas (Moxon y Wills 1999). Otras posibles causas para la generación de polimorfismo son otros tipos de mutaciones, como las eliminaciones e inserciones, ya sean en el microsatélite en sí o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región microsatélite. La duplicación de una secuencia microsatélite en otra región del genoma da lugar a la generación de marcadores microsatélites multilocus (Jarne y Lagoda 1996; Villamón 2000).

Los microsatélites fueron inicialmente descritos en humanos, y en poco tiempo fueron hallados en otros mamíferos como el ratón y el cerdo. Su potencial como marcadores útiles para los estudios en plantas fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies (Rossetto *et al.* 1999). Es así, que los principales cultivos en la actualidad cuentan con una base de datos con apreciable cantidad de microsatélites como es el caso de la papa (Milbourne *et al.* 1998), yuca (Mba *et al.* 2001), arroz (Cho *et al.* 2000), trigo (Bryan *et al.* 1997), cebada (Dávila *et al.* 1999) y recientemente para la papaya ( Universidad de Hawaii en Manoa 2008).

La identificación de secuencias microsatélites en la papaya ha sido factible debido a la secuenciación del genoma de la papaya, por la Universidad de Hawaii.

En la mayoría de los casos, la interpretación de los microsatélites como de los intermicrosatélites se realiza como alelos codominantes. Este análisis es realizado mediante el análisis en geles de poliacrilamida, para separar las bandas polimórficas de acuerdo al tamaño de la secuencia. (Dowling *et al.*, 1996).

a. Características de los microsatélites. Las características de los microsálites como ejemplo casi perfecto de marcadores moleculares es muy variable, y al mismo tiempo muy importante. Como ya se ha especificado con anterioridad, existen mucho marcadores moleculares, pero solamente los microsálites mantienen un amplio margen de variabilidad. La razón principal del incremento del uso de los SSRs como una herramienta molecular es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o PIC (Polymorphic Information Content) en comparación con otras técnicas como RFLPs y RAPDs (Powell *et al.* 1996). Poseen, además, muy valorables atributos que incluyen:

- Ser altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados. La herencia codominante permite diferenciar con facilidad, entre individuos diploides sin ningún problema.

- Ser técnicamente simples: la tecnología del PCR puede fácilmente y rápidamente ser utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.

- Ser una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de DNA son requeridas.

- Ser analíticamente simples: los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles. Al mismo tiempo, la información que se suele obtener a través de ellos, suele ser de fácil análisis. Otras técnicas moleculares requieren el uso de equipo software altamente efectivo para analizar la compleja estructura del patrón de huella digital obtenido. En cambio los microsálites por su escaso número de bandas, permite realizar un análisis manual de la información.

- Ser muy abundantes: los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma.

- Ser ampliamente aplicables: los *loci* son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros (Yáñez 2002).

b. Clasificación de los microsatélites. Los microsatélites se clasifican de acuerdo a su secuencia. De esta manera existen de tipo puro (o perfecto), en los cuales una secuencia corta se repite varias veces. De tipo compuesto en los cuales dos secuencias cortas se repiten varias veces. Finalmente los de tipo complejo, que se utilizan para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran

presentes a lo largo de un locus microsatélite dado. Un ejemplo de cada uno de los tipos de microsatélite se muestra en el Cuadro 5 (Chambers y MacAvoy 2000) (Suresh, *et al.* 2007).

CUADRO 5. Tipos y ejemplos de microsatélites

Tipo de microsatélite	Ejemplos
SSR Puro	(ACC)9
SSR Interrumpido puro	(ACC)6 -TG - (ACC)7
SSR Compuesto	(ACC)5 -(TTG)9
SSR Interrumpido compuesto	(ACC)8-TG-(ACC)5-GA-(TTA)6
SSR Complejo	(ACC)-TG-(GA)12-(TTA)5-GC-(TTA)4+3

(Yáñez 2002).

c. Ventajas de los microsatélites. Los microsatélites presentan más ventajas en su utilización, que desventajas. Algunas de estas ventajas son que se requiere ADN en baja concentración y con una pureza no muy alta, y que luego de su amplificación, su interpretación es bastante sencilla, haciendo posible un buen estudio analítico, altamente reproducible (IAEA 2002).

d. Limitaciones de los microsatélites. La única limitación significativa de los microsatélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para la clonación y secuenciación de los *loci* SSR (IAEA 2002).

Por otro lado, se darían limitaciones con menor frecuencia o efecto, en el caso que mutaciones ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores, tengan como resultado alelos nulos. Otra limitación es la presencia de "bandas tartamudas". Estas últimas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo

como es el caso de los microsatélites. Las "bandas tartamudas" son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico (IAEA 2002).

e. Aplicaciones de los microsatélites. Los microsatélites al igual que otros marcadores moleculares, han sido utilizados para diversos fines. Una de sus aplicaciones radica en el estudio de las especies frutales del trópico. Entre estos estudios, su uso más frecuente corresponde a la estimación de la diversidad genética intra e inter poblacional. Para ello, permite el desarrollo de mapas de ligamiento para el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies, para la caracterización de germoplasma, identificación de genotipos, determinación de pureza, aislamiento y caracterización de genes específicos (Azofeifa-Delgado 2006) (Suresh *et al.* 2007).

f. Iniciadores utilizados para amplificar secuencias microsatélites de papaya. En el Cuadro 6 se presentan los nombres, secuencias y temperatura de fusión (Tm) de los iniciadores a utilizarse en este estudio para las regiones microsatélites de papaya maradol. Estos iniciadores fueron diseñados por PBSEL (Papaya BAC-end sequence library) de la Universidad de Hawaii en Manoa.

CUADRO 6: Secuencias de iniciadores utilizados para la amplificación de microsatélites en papaya

Nom- bre del ini- ciador	Patrón SSR	Ta- maño se- cuencia SSR	Tm	Secuencia del iniciador	Tamaño del producto que amplifica
PM1	TAA	24pb	52.0°C 52.7°C	5'-CATGCAGACCCAAAAACAAA-3' 5'-TTGCTTCTCATCGTCTTCCC-3'	131pb.
PM2	AAC	24pb	52.3°C 52.6°C	5'-AGATTCACCCACTTGCATCC-3' 5'-GGTGTGTCCCAGTCTCCATC-3'	167pb.
PM3	TTC	21pb	52.6°C 52.6°C	5'-CTTGCCGCTTCTTCTTTGTC-3' 5'-CAAAAACGCGATGGATTCTT-3'	211pb.

Continuación Cuadro 6.

Nom- bre del ini- ciador	Patrón SSR	Ta- maño se- cuencia SSR	Tm	Secuencia del iniciador	Tamaño del producto que amplifica
<b>PM4</b>	CATA	20pb	52.6°C 52.5°C	5'-CCATCCATTGTAATGTGGCA -3' 5'-GCAAGGGAACAAGCTCAAAG- 3'	314pb.
<b>PM5</b>	AAG	21pb	52.5°C 52.5°C	5'- CCAAACCTGGGCATTAGAAA - 3' 5'- CGTAAACTGACATCCATGCG-3'	493pb.
<b>PM6</b>	ATCA	32pb	52.2°C 52.9°C	5'-ACTCATCGTCATCTCACCCC-3' 5'-CCGTTGAGCTTTGATTCCAT-3'	297pb.

(Universidad de Hawaii en Manoa 2008)

11. Secuencias simples Intermicrosatélites (ISSR). Los ISSRs son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT)<sub>n</sub> ó (CA)<sub>n</sub>, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (IAEA 2002).

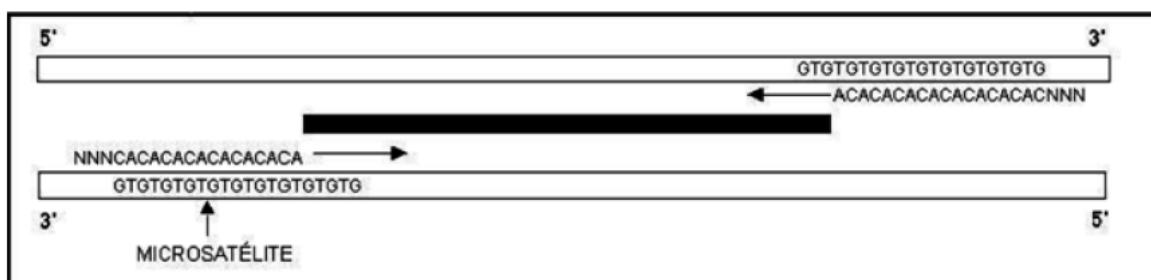
Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o iniciador complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto) (González 2005).

Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el iniciador complementario a ella puede inducir la amplificación del segmento de ADN intermedio.

La molécula generada, con un tamaño particular (masa molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella digital genética” de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el iniciador y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (IAEA, 2002).

En la Figura 3 se muestra un ejemplo de la amplificación de una región intermicrosatélite.

FIGURA 3: Amplificación de una secuencia intermicrosatélite, realizada por un iniciador  $(CA)_N$  anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras. Amplificación del segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélites en orientación invertida.



(González 2005)

Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes como ya se ha mencionado anteriormente. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homócigo o heterócigo), mientras que su ausencia representa el genotipo homócigo recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus (González 2005).

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores:

- La no existencia de un sitio de unión completo al primer debido a una mutación,

- Rearreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis, inserciones o eliminaciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente (González, 2005).

a. Ventajas y desventajas en la utilización de ISSR´s. Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Asimismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado, para diseñar los iniciadores no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida. Finalmente, son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos (González 2005).

En cuanto a las desventajas, la homología de las bandas es incierta. Y dado que son marcadores dominantes, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterócigos de los homócigos dominantes (como FIS y FIT) (González 2005).

Asimismo, para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir *a priori* que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (González 2005).

b. Iniciadores utilizados para la determinación de ISSR. En el Cuadro 7 se muestran las secuencias y los nombres de los dos iniciadores diseñados por Awashi y colaboradores (2006), con el fin de amplificar secuencias intermicrosatélites en cualquier tipo de planta. Esto se debe al alto contenido de repeticiones de guaninas (G) y citocinas (C) en las secuencias.

CUADRO 7: Secuencias de los iniciadores para la amplificación de intermicrosatélites.

<b>Nombre</b>	<b>Patrón de repetición</b>	<b>Tm</b>	<b>Secuencia del iniciador</b>
<b>IPM1</b>	(TG) <sub>7</sub> Y	51.3°C	(CAT)(GCA)(CAT)(TG) <sub>7</sub> Y
<b>IPM2</b>	(CA) <sub>7</sub> Y	51.6°C	(GCT)(AGT)(GCT)(CA) <sub>7</sub> Y

(Awasthi *et al.* 2004)

12. Genética de poblaciones. Los marcadores moleculares, tales como los microsatélites y los intermicrosatélites son muy útiles para medir pequeñas variaciones genéticas entre organismos muy relacionados, como se ha expuesto con anterioridad. Aún así se necesitan de herramientas estadísticas poderosas que permitan medir el verdadero nivel de significancia entre las posibles variabilidades. La determinación de la heterocigocidad y el nivel de relación entre las plantas de papaya maradol muestreadas, pueden ser determinadas mediante las funciones estadísticas mostradas a continuación.

a. Frecuencia alélica en las poblaciones: También llamada frecuencia génica es la proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población. Si las frecuencias permanecen constantes de una generación a la siguiente, la población no está experimentando cambio evolutivo, y se dice que está en equilibrio génico. Sin embargo, los cambios en las frecuencias alélicas en generaciones sucesivas implican que ha ocurrido evolución (Martínez 2007).

b. Equilibrio de Hardy-Weinberg: El equilibrio de Hardy-Weinberg es una extensión de las leyes de herencia de Mendel. En las leyes de Hardy-Weinberg se describe la relación esperada entre las frecuencias de los alelos en una población, al mismo tiempo que considera las frecuencias de varios genotipos en esa misma población. Para realizar una determinación del equilibrio de una población, mediante Hardy-Weinberg es preciso realizar un muestreo de un cierto número de individuos. A partir de este muestreo se estiman las frecuencias genotípicas y alélicas (Wallace 1981). Los números observados y esperados se comparan usando una prueba no paramétrica, tal como Chi cuadrado ( $X^2$ ). Los grados de libertad se calculan como  $n(n-1)/2$ , en donde  $n$  es el número de alelos. Para poder concluir que el modelo se ajusta a la población en estudio, la probabilidad obtenida deber ser mayor o igual a 0.05 (Ewens 2000).

c. Heterozigosidad: En las poblaciones existe variabilidad debida a causas genéticas o bien debidas a causas ambientales. La variación genética puede medirse por polimorfismos o heterozigosidad. La heterozigosidad es la frecuencia media de individuos heterocigóticos en una población. Se estima calculando la frecuencia de heterocigóticos para cada locus y dividiendo por el total de *loci*.

d. Árboles filogenéticos: Un árbol filogenético es una representación gráfica de datos, que organiza en subcategorías los datos, permite observar la relación genética entre dos individuos. De esta manera se permite establecer el grado de emparentamiento existente entre los organismos. El método usado para determinar árboles filogenéticos es el de NJ (*Neighbour Joining*) expuesto por Saituo y Nei. Para ello debe calcularse las distancias (porcentaje de divergencia) entre todos los pares de secuencias de un alineamiento múltiple (Martínez 2006).

## B. Objetivos

### 1. General.

Comparar la genética poblacional de la papaya Maradol (*Carica papaya* L.) producida en los departamentos de Escuintla y Retalhuleu a partir de semilla certificada (F1), con la primera generación (F2) producida a partir de semillas obtenidas de cultivos previos.

### 2. Específicos

- Optimizar la técnica de extracción de ADN y amplificación por PCR para detectar el tamaño de secuencias microsatélites para la variedad de papaya Maradol.
- Determinar la utilidad de los iniciadores amplificadores de secuencias microsatélites, como marcadores moleculares de muestras de papaya Maradol.
- Optimizar la técnica de amplificación por PCR para detectar los patrones polimórficos de las secuencias intermicrosatélites para la papaya variedad Maradol.

### C. Hipótesis

Existe diferencia genética observada por microsatélites e intermicrosatélites polimórficos, entre la población de papaya Maradol (*Carica papaya* L.) cultivadas a partir de semillas no certificadas (F2), con las poblaciones cultivadas a partir de semillas certificadas (F1) de los departamentos de Escuintla y Retalhuleu.

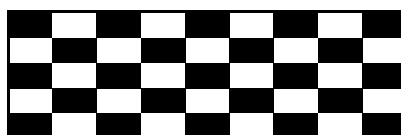
## II. METODOLOGÍA

### A. Colecta de muestras.

Se recolectó un total de 60 muestras de la variedad de papaya maradol (Carica papaya L.) en los departamentos de Escuintla y Retalhuleu (ver figura 4). De cada uno de los departamentos se recolectó: 15 muestras compuestas por hojas jóvenes provenientes de plantas de papaya Maradol cultivadas a partir de semillas certificadas; y las 15 muestras de papaya Maradol que provendrán de árboles de papaya cultivados a partir de semillas no certificadas (semillas obtenidas del cultivo original certificado). Las muestras provenientes del municipio La Borrera, Escuintla se recolectaron en la finca El Obraje (Longitud: N 14.15018, Latitud: W 091.02636, Altitud: 170 m SNM) (las semillas certificadas utilizadas son provenientes de Pilonos de Antigua), en tanto las muestras provenientes del municipio de Retalhuleu, Retalhuleu fueron colectadas en la finca Santa Elena Longitud: N 14.43774, Latitud: W 091,76779 Altitud: 86 m SNM) (las semillas certificadas utilizadas son provenientes de Frutas Maya).

Para ello, la muestra de cada uno de los árboles consistió de dos hojas de papaya Maradol, de árboles entre 2 a 4 semanas de edad. Se muestreó la totalidad de los árboles de manera aleatoria. De cada árbol de papaya muestreado se tomó dos hojas provenientes de la parte superior del árbol (región comprendida entre 60cm desde la copa del árbol). Las muestras fueron elegidas mediante el método aleatorio sin reemplazo. La elección de cada árbol de papaya se realizó de manera alternada. El siguiente cuadro muestra la disposición de los árboles elegidos.

CUADRO 8 : Forma de muestreo de árboles de papaya. Los cuadros coloreados de negro indican los árboles muestreados, en tanto los cuadros claros indican los árboles no utilizados en el estudio y por consiguiente no muestreados.



Las muestras fueron empacadas en bolsas plásticas ziploc y transportadas en frío al laboratorio.

Al momento de ingresar las muestras al laboratorio, se tomó una porción de cada una de las hojas, tratando de evitar las venas, la cual fue introducida en tubos cónicos marca Corning de 50mL para ser almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante tres días. Después de esto, se procedió a su liofilización en un liofilizador marca Labconco 4.5 , durante un período de dos días.

Las muestras liofilizadas fueron almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

FIGURA 4: Mapa de Guatemala donde se muestra la locación del municipio de Escuintla (mostrado en color gris oscuro) y Retalhuleu (mostrado en color gris pálido).



## B. Extracción de material genético.

Se tomó 0.1g de hoja de cada muestra liofilizada, para ser pulverizada en un tubo eppendorf de 1.5mL mediante la utilización de un palillo de madera. El ADN genómico de cada muestra fue extraído mediante la utilización de 0.4mL del reactivo de extracción comercial, plant DNAzol manufacturado por Invitrogen®. Este procedimiento se realizó

siguiendo las especificaciones del fabricante. Se mezcló por inversión y luego se incubó con movimiento a 25°C por 5 minutos.

Se añadió 0.3mL de cloroformo. Se mezcló vigorosamente. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga marca Eppendorf 5415C a 12,000g por 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante conteniendo el material genético, a otro tubo.

Se precipitó el ADN mediante la adición de 0.225mL de etanol grado absoluto al 100%, marca Merck. Para una posterior centrifugación a 5,000g por 4 minutos, con el fin de sedimentar el ADN. Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado de ADN con una mezcla de un volumen de Plant DNAzol en 0.15 volúmenes de etanol al 100%. Se adicionó 0.3mL de la mezcla por tubo.

Se removió la solución de lavado y se adicionó 0.3mL de etanol al 75%. Se mezcló vigorosamente y luego se centrifugó a 5,000g por 4 minutos. Se decantó el etanol, y se dejó secar a temperatura ambiente el precipitado.

Los precipitados de ADN se re suspendieron en 150ul de agua destilada, y se almacenaron -20°C.

### C. Verificación de la integridad del ADN extraído.

La integridad del ADN extraído se realizó mediante la corrida de las muestras en una cámara de electroforesis horizontal. Las características de la cámara y la corrida se muestran en el Cuadro 7.

CUADRO 9 : Soluciones y materiales utilizados para la verificación de la integridad del ADN.

<b>Tipo de material o solución utilizada</b>	<b>Descripción / cantidad</b>
<b>Cámara de electroforesis</b>	Marca horizontal Apollo Dimensiones: 7 x 10 (cm)
<b>peine</b>	12 pozos de 1mm de ancho.

Continuación Cuadro 9.

<b>Tipo de material o solución utilizada</b>	<b>Descripción / cantidad</b>
<b>Solución de agarosa</b>	Concentración: 1% Volumen utilizado: 30mL
<b>Amortiguador TBE (Tris, EDTA y ácido bórico)</b>	Concentración: 1x Volumen: 1L
<b>Amortiguador TBE (Tris, EDTA y ácido bórico)</b>	Concentración: 1x Volumen: 1L
<b>Solución de bromuro de etidio</b>	Descripción: tinción de ADN. Concentración stock: 10mg/ml
<b>Muestra de ADN</b>	Volumen depositado por pozo: 7ul.
<b>Condiciones eléctricas de corrida</b>	55V, amperaje constante por 30 minutos

1. Procedimiento. Se preparó la cámara de electroforesis y sus piezas, enjuagándolas con agua destilada. Se colocó dos peines por cámara. Los peines se colocaron a una distancia de 6cm de separación. Para la preparación de la solución de agarosa se utilizó 0.3g de agarosa de Promega en 30mL de amortiguador TBE 0.5X. Se fundió la solución por calentamiento a ebullición en microondas durante 25 segundos. La solución de agarosa se vertió en la cámara de electroforesis y se dejó reposar con el fin de permitirle gelificar. Se agregó un volumen de 100mL aproximadamente de amortiguador TBE 1X en la cámara (Ávalos 2004).

Se impuso las condiciones de corrida de ADN mostradas en el Cuadro 7, mediante la utilización de una fuente de poder marca VWR, modelo 5000. Al finalizar la electroforesis, el gel fue expuesto al contacto con la solución de bromuro de etidio, en

una bandeja de plástico. La tinción se llevó a cabo durante 6 minutos. Se removió el exceso de bromuro de etídio, sumergiendo el gel durante 1 minuto en agua destilada (Ávalos 2004).

La visualización de bandas de ADN se realizó mediante la utilización de un Transiluminador ultravioleta marca UVP, bioDoc-it. La fotografía fue tomada a una resolución de 3.2. El gel contaminado con bromuro de etídio se descartó como un sólido contaminado (Ávalos 2004). El criterio de verificación de integridad de ADN utilizado fue que las muestras presentaran poco o nada de cola en el carril de corrida (Ávalos 2004).

#### D. Cuantificación y determinación de la pureza del ADN extraído.

La cuantificación y determinación de la pureza de las muestras de ADN extraído, se realizó en un espectrofotómetro UV-visible, con las características mostradas en el Cuadro 8.

CUADRO 10. Soluciones y materiales utilizados para la cuantificación y determinación de pureza del ADN extraído por muestra.

<b>Tipo de material o solución utilizada</b>	<b>Descripción / cantidad</b>
<b>Espectrofotómetro ultravioleta</b>	Marca: Thermospectronic.
	Modelo: Genesys 10UV.
<b>celda</b>	Material: cuarzo.
	Capacidad: 400ul
<b>Tipo de análisis</b>	ADN de doble hebra
<b>Factor de dilución de ADN</b>	322.33 (3uL de muestra en 967uL de agua destilada)

1. Procedimiento. Usando un espectrofotómetro Genesys 10UV, se seleccionó el tipo de análisis cuantificación ADN/ARN, antes indicado (Cuadro 8).

Se utilizó como blanco para el espectrofotómetro, agua destilada. Esto es debido a que el ADN extraído se encuentra re suspendido en agua del mismo tipo.

Se agregó 3ul de ADN en 967ul de agua destilada. Se homogenizó por inversión.

Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 260, 280 y 320nm. (Ávalos 2004).

Para calcular la concentración de ADN extraído se utilizó la siguiente ecuación:

Concentración ADN (ng/uL) =  $(A_{260} - A_{320}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (\text{Factor de corrección})$

Factor de corrección: 50ng/uL.

Para calcular la pureza del ADN extraído se utilizó la siguiente ecuación:

Pureza de ADN =  $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$

## E. Determinación de la diversidad por microsatélites (SSR)

1. Amplificación de SSR. Se amplificó las secuencias SSR del ADN de las muestras obtenidas de los principales departamentos de Guatemala que producen papaya maradol. La amplificación se realizó mediante el uso de iniciadores y de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Los iniciadores utilizados se muestran en el Cuadro 6. Estos iniciadores fueron elegidos de acuerdo a la variedad de oligonucleótidos que detecta, su  $T_m$  similar entre ellos, y por la amplificación de bandas de variada masa molecular.

Las concentraciones finales de los reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa son:  $MgCl_2$  (Promega) 2mM, Amortiguador de Reacción (Promega) 1X, dNTP (Promega) 2.5mM cada uno, iniciadores de amplificación (IDT) 10uM cada uno y Taq polimerasa (Promega) 0.02U/ul; llevados a un volumen final de reacción de 20uL con

agua destilada y desmineralizada. Posteriormente los tubos de reacción fueron colocados en un termociclador marca Eppendorf Mastercycler personal, siguiendo el programa mostrado en el Cuadro 9.

Es importante mencionar que Los iniciadores liofilizados por el proveedor fueron re suspendidos con agua destilada y desmineralizada, a una concentración de almacenaje de 100uM. Las concentraciones de trabajo son de 10uM.

Al igual que para la técnica de análisis por intermicrosatélites, se utilizó como controles material genético extraído de plántulas cultivadas en pilones en los invernaderos de la Universidad del Valle de Guatemala. Estas plántulas fueron crecidas en condiciones controladas a partir de semillas certificadas, provistas por Frutas Maya. Se utilizó como controles dos semillas certificadas de maradol y dos semillas de papaya hawaiana. Además se incluyó un control de ADN de tomate, provisto por el kit de AFLP de Invitrogen. Los controles fueron tratados de la misma manera que las muestras, desde la extracción de ADN hasta la posterior amplificación por PCR.

CUADRO 11: Programa de amplificación de PCR para SSR de papaya.

<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1</b>	5 minutos	94°C
<b>2</b>	45 segundos	94°C
<b>3</b>	1 minuto	56°C
<b>4</b>	1 minutos	72°C
<b>5</b>	Repetir paso 2 al 4, 40 veces	-
<b>6</b>	7 minutos	72°C
<b>7</b>	indefinido	4°C

2. Preparación del gel de poliacrilamida. Los productos de amplificación de las secuencias obtenidas mediante SSR se separaron utilizando geles de secuenciación,

visualizándose así los patrones de diferenciación entre las bandas amplificadas de las papayas; con posterior tinción con plata.

3. Preparación de cristales o placas de vidrio. Se sumergieron los dos cristales (uno grande y uno pequeño) durante 2 horas en una solución de hidróxido de sodio (Merck) al 10%. Se lavó los cristales con detergente común, mediante la utilización de una esponja.

Se enjuagó con agua destilada y etanol al 70%. Los cristales se secaron a temperatura ambiente.

Se le aplicó al cristal pequeño una vez seco, una dilución de solución adherente Bind silane de Sigma (en el Cuadro 10 se presenta su preparación) ( en una proporción de 6uL de Bind silane en 1mL de agua destilada), mediante la utilización de un Kimwipe. Esta aplicación se realizó dos veces.

Se aplicó 2mL de solución Sigmacote de Sigma al cristal grande. Se dejó secar ambas soluciones en los cristales.

Se colocaron tres separadores de plástico 0.4mm de espesor, entre los cristales, uno a cada lado, y el tercer separador en la parte inferior (las caras de los cristales que fueron impregnadas con las soluciones Bind silane y Sigmacote, deberán quedar hacia adentro, una frente a la otra).

Se sujetó ambos cristales con pinzas, a lo largo del borde, sobre los separadores.

CUADRO 12. Preparación de la solución de Bind silane.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Etanol al 95%</b>	15mL
<b>Ácido acético glacial, grado reactivo (Merck)</b>	75uL
<b>Metacriloxipropil-trimetoxisilano</b>	75uL

4. Preparación del gel. Los reactivos y las cantidades utilizadas para elaborar 75mL de gel de poliacrilamida al 6% y urea a 7.5M, se muestran en el Cuadro 11.

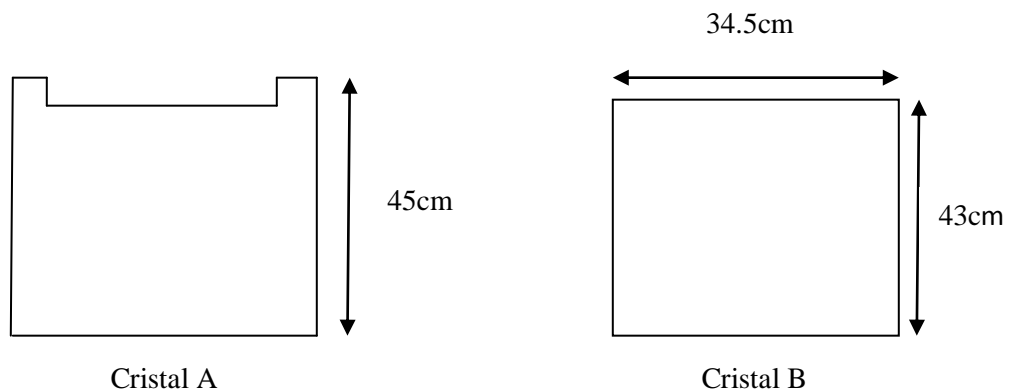
CUADRO 13. Nombre de los reactivos y sus respectivas cantidades utilizadas en la elaboración del gel de acrilamida.

<b>Nombre del reactivo</b>	<b>Cantidad utilizada</b>
<b>Urea (Merck)</b>	30g
<b>Amortiguador TBE 5X</b>	15mL
<b>Solución de acrilamida (Merck) 40%, 19:1</b>	10mL
<b>Solución TEMED</b>	99.92uL
<b>Solución APS (Persulfato de amonio)</b>	312.12uL
<b>Agua destilada</b>	Aforar a 75mL

Las soluciones de TEMED y APS se añadieron a la solución justo antes de verter el gel entre los dos cristales para su polimerización.

La solución del Cuadro 11 se vertió entre los dos cristales evitando la formación de burbujas. Se utilizaron dos cristales que se muestran en la figura 4 . El cristal A tiene un tamaño de 34.5 x 45cm. Y el cristal B de 34.5 x 43cm. Inmediatamente se colocó un peine invertido de dientes de tiburón, en la parte superior, cuidando de introducirlo 0.5cm en el gel. Esto se hace con el fin de delimitar una línea superior del gel.

Figura 5. Diseño de los cristales A y B de la cámara de electroforesis.



Se dejó polimerizar la acrilamida durante 40 minutos.

Se retiraron las pinzas, el peine y el separador inferior. Se limpió con una toalla de papel húmeda, la parte exterior de los cristales, con el fin de remover cualquier remanente de poliacrilamida exterior.

El conjunto de cristales y gel, se colocó en una cámara de electroforesis vertical de 34.5 x 45cm, marca ThermoElectron EC 1600.

Se volvió a colocar el peine de dientes de tiburón, pero esta vez los dientes posicionados de tal manera que penetren 4mm aproximadamente del gel. El peine utilizado consta de 50 pozos, y su tamaño es de 30.5cm de largo y 0.4mm de espesor.

Inmediatamente después se vertió 1.5L de amortiguador TBE 1X (Tris 0.89 M, Ácido bórico (Merck) 0.89M, EDTA 0.025M) en los sitios respectivos de la cámara de electroforesis. (Avalos, 2004)

5. Pre-corrída del gel. Se precalentó el gel durante 30 minutos a 1435V, 44mA y 60W.

6. Preparación de muestras de ADN. Durante el tiempo de pre-corrída, se prepararon las muestras que se agregaron al gel. Para ello, a cada muestra se le agregó solución desnaturalizante (NaOH 10mM, formamida (Merck) 95%, azul de bromofenol (Merck) y naranja G (Merck) al 0.05%) en una relación 1:1 con el volumen de muestra.

Las muestras fueron desnaturalizadas en un termociclador marca Eppendorf Mastercycler personal a 94°C por 5 minutos; y luego colocadas en hielo durante 2 minutos.

7. Carga de las muestras en el gel. Se cargó cada pozo con un volumen final de 6uL de mezcla de producto de amplificación y solución desnaturalizante a cada pozo.

Se utilizó una escalera de marcador molecular estándar de 50pb (Invitrogen).

8. Corrida de las muestras. Las muestras se corrieron en el gel de poliacrilamida a 1400V, 56mA y 60W por 2 horas.

9. Post- corrida de muestras. Luego de la corrida de muestras, se aplicaron las siguientes condiciones: 1300V, 38mA, 50W por 45 minutos.

Una vez terminado el tiempo de post- corrida, se drenó el amortiguador de la cámara de electroforesis y se removieron los cristales con el gel.

Se separaron ambos cristales, y el cristal que contenían el gel se sumergió en solución de ácido acético glacial (Merck) al 10% durante 30 minutos, con agitación moderada y constante.

La elaboración de la solución de ácido acético glacial se muestra en el Cuadro 12.

CUADRO 14: Preparación solución de ácido acético al 10%.

<b>reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Ácido acético glacial (Merck)</b>	150mL
<b>Agua destilada</b>	1350mL

10. Tinción del gel con nitrato de plata. Se guardó la solución de ácido acético para un paso posterior.

El cristal con el gel se lavó tres veces con 1L de agua destilada y agitación moderada.

Se sumergió el cristal con el gel en solución de nitrato de plata durante media hora, con agitación constante y velocidad moderada.

La preparación de la solución de nitrato de plata se muestra en el Cuadro 13 .

CUADRO 15: Preparación de la solución de nitrato de plata.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Nitrato de plata (Merck)</b>	1.5g
<b>*Formaldehído al 37%</b>	2.25mL
<b>Agua destilada</b>	1.5L

Mientras el gel se encontraba sumergido en la solución de nitrato de plata, se procedió a preparar la solución de carbonato de sodio, mostrada en el Cuadro 14. Al terminar los 30 minutos en nitrato de plata, se lavó el cristal con el gel, sumergiéndolo durante 2 minutos en agua destilada. Este lavado se realizó dos veces.

CUADRO 16: Preparación de la solución de carbonato de sodio.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Carbonato de sodio (Merck)</b>	30g
<b>*Tiosulfato 2% (Merck)</b>	2.5uL
<b>*Formaldehído 37%</b>	1.5mL
<b>Agua destilada</b>	1L

*\*Estas soluciones se mantuvieron en el congelador a 4°C hasta su uso. Y se agregaran tanto a la solución de nitrato de plata como a la de carbonato de sodio, antes de ser utilizadas.*

Inmediatamente luego que se agregó el formaldehído y el tiosulfato, se vertió la solución de carbonato de sodio, sobre el gel. Se agitó manualmente hasta que la solución empezó a oscurecer y en el gel se comenzó a distinguir las bandas de ADN. En este momento se desechó la solución de carbonato de sodio. Su decantación se realizó vertiéndola en la solución de nitrato de plata previamente utilizada. De esta manera se precipitó la plata para su desecho.

Una vez retirado el gel de la solución de carbonato de sodio, se sumergió el cristal con el gel en la solución de ácido acético, previamente utilizada. El cristal con el gel permaneció en esta solución por 20 minutos.

Se enjuagó luego con agua destilada y se dejó secar.

Mediante el uso de un digitalizador marca Cannon se copió el gel de manera electrónica.

## F. Amplificación de secuencias intermicrosatélites (ISSR)

1. Amplificación de ISSR. Se amplificó las secuencias ISSR del genoma de la papaya mediante la técnica de PCR, haciendo uso de dos iniciadores diseñados por Awashi y colaboradores (2006), mostrados en el cuadro 7.

Las concentraciones finales de la solución de la reacción en cadena de la polimerasa fueron:  $MgCl_2$  (Promega) 2mM, amortiguador de reacción (Promega) 1X, dNTP (Promega) 0.1mM cada uno, iniciadores de amplificación (IDT) 6.0uM cada uno y Taq polimerasa (Promega) 0.02U/ul; llevados a un volumen final de reacción de 25uL con agua destilada y desmineralizada. En el cuadro 15 se muestra el programa de PCR para amplificar las secuencias ISSR.

Los iniciadores liofilizados por el proveedor fueron re suspendidos con agua destilada y desmineralizada, a una concentración de almacenaje de 100uM. Las concentraciones de trabajo fueron de 10uM.

CUADRO 17: Programa de PCR para la amplificación de ISSR

<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1</b>	2 minutos	94°C
<b>2</b>	30 segundos	94°C
<b>3</b>	45 segundos	52°C
<b>4</b>	2 minutos	72°C
<b>5</b>	Repetir paso 2 al 4, 30 veces	-
<b>6</b>	7 minutos	72°C
<b>7</b>	indefinido	4°C

Las condiciones de corrida en gel de poliacrilamida, fueron llevadas a cabo de igual manera que para la visualización de las secuencias microsátélites.

#### G. Análisis de resultados.

Se analizó los patrones de bandas mediante el programa de computación Totallab TL120 versión 2006. El tamaño de banda de cada alelo por muestra fue determinado por el mismo programa. Las masas moleculares de cada alelo fueron ingresados al programa Excel de Microsoft. Por medio de la aplicaciones disponibles en los programas Arlequín 3.1, Popgene 1.31 y GenePop 4.0 se determinó la heterocigosidad de la población, el equilibrio de Hardy Weinberg, y las distancias genéticas para la elaboración de los dendrogramas por los métodos Neighbor joining y UPGMA.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Cuantificación y determinación de la pureza de ADN extraído de papaya.

El ADN extraído de cada una de las muestras de papaya de ambas localidades, fue evaluado en pureza y cuantificado mediante el procedimiento espectrofotométrico.

Como se observa en el Cuadro 18, se muestra la absorbancia de cada una de las muestras de ADN de papaya, junto a su respectiva concentración y pureza de ácido nucleico extraído. Con respecto a la pureza de las muestras, la mayoría se encuentra entre el rango aceptado de 1.8 a 2.0. Otro grupo limitado de muestras muestran una pureza menor a 1.8, indicando contaminación por proteínas, y finalmente un grupo menor presenta pureza mayor a 2.0, indicando contaminación por ARN (ácido ribonucleico).

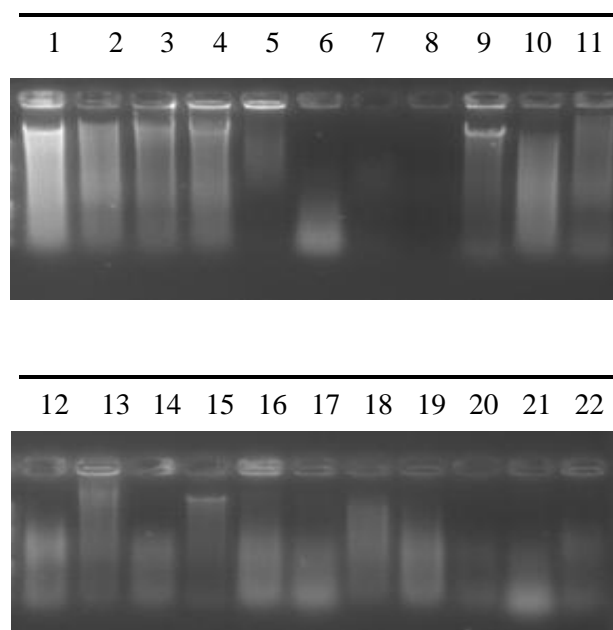
Debido que para el fin de que se pretende utilizar el ADN extraído no requiere de una gran pureza, se procedió a utilizar las muestras con estos niveles de separación.

Con respecto a la concentración de ADN extraído, se observa en el mismo cuadro que los niveles oscilan entre 220 a  $450 \pm 63.67$  ng/ul. Esta cantidad de ADN se consideró adecuada para realizar la investigación.

B. Evaluación de la integridad del ADN extraído.

Con el fin de evaluar la calidad del ADN extraído de las papayas, se procedió a realizar una electroforesis horizontal en agarosa al 1%. Para ello se utilizó 22 muestras de ADN puro extraído, escogidas al azar. Los resultados de tal corrida electroforética se muestran en la Figura 5.

FIGURA 6: Patrón de corrida electroforética de muestras de ADN de papaya; en gel de agarosa al 1%. Cada número superior, indica el número de pozo y de muestra.



Como se observa en la Figura 5, el método de extracción de ADN proporciona una integridad variable de ADN. En algunos casos el ADN extraído queda sumamente dañado como se observa en las muestras 6 y 7, pero debido a que la amplificación por marcadores moleculares no requiere de un ADN altamente íntegro, se procedió a su utilización. El ADN presente en las muestras 1 – 4, 9 y 13 presentan altos niveles de integridad. El ADN utilizado para las pruebas, fue constantemente reemplazado, por ADN recién extraído.

### C. Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de SSR.

Con el fin de amplificar las secuencias microsatélites contenidas en el genoma de las plantas de papaya Maradol, se probó cuatro distintos programas de amplificación para ser utilizados en el termociclador. Los programas antes mencionados se muestran en el Cuadro 19, divididos por las letras A – C.

La selección de los posibles programas de PCR se realizó mediante la variación de: el tiempo necesario para la desnaturalización inicial del ADN (paso 1), el tiempo necesario para la desnaturalización previo a iniciar el anillamiento de los iniciadores (paso 2), la

temperatura de anillamiento (paso 3), el número de repeticiones en que se lleva a cabo la amplificación (paso 5), y en el tiempo requerido para la elongación (paso 6).

Los resultados obtenidos mostraron que el programa (A) fue el más adecuado para realizar una buena y eficiente amplificación, lo bastante selectiva como para no obtener productos inespecíficos. Esto se debe en su mayoría a que la temperatura de anillamiento es cuatro grados Celcius superior al  $T_m$  de cada uno de los iniciadores utilizados (Cuadro 6). El programa (B) en cambio, posee una temperatura de anillamiento de  $58^{\circ}\text{C}$ , seis grados superior al  $T_m$  aparente.

Esto demuestra que tratar de amplificar las secuencias microsátélites, con una temperatura de anillamiento de  $58^{\circ}\text{C}$ , resulta ser muy astringente. El anillamiento a  $56^{\circ}\text{C}$  aún conserva cierto grado de astringencia para la amplificación selectiva, sin permear la propia amplificación de las secuencias SSR.

Con respecto al resto de variaciones, se encontró que no son determinantes. Se prefirió trabajar con una repetición de ciclos de cuarenta veces en lugar de treinta, con el fin de asegurar una cantidad significativa de ADN amplificado. A su vez el tiempo de elongación se mantuvo en siete minutos, debido a la mayoría de programas utilizados en trabajos previos los mostraba como un tiempo frecuente.

Se probaron distintas concentraciones finales de reactivos para lograr la amplificación por PCR. Las variaciones realizadas se muestran en el Cuadro 20. El protocolo B, mostrado en el Cuadro 19 de la sección de anexos, debido a que utiliza una menor cantidad de iniciadores y de Taq polimerasa.

#### D. Optimización de la técnica de visualización de bandas por gel de acrilamida.

Debido a que las condiciones de suministro de energía eléctrica en la Ciudad de Guatemala son sumamente variables; las bandas separadas por los geles de poliacrilamida utilizados se obtenían con sesgos, desviaciones, inclinaciones, curvaturas entre otras. Por esta razón se implementó el paso denominado post-corrída, señalado en la sección de

metodología. El siguiente paso, el cual se realiza inmediatamente después de la corrida, se lleva a cabo mediante la imposición de condiciones eléctricas mucho más pequeñas (tanto en potencia como en corriente eléctrica) con el fin de lograr un desplazamiento mucho menor y más controlado de los pequeños fragmentos de cada una de las bandas que no lograron asentarse por completo.

Los resultados obtenidos en los geles (Figuras 6-15), muestran que la implementación de la post-corrida permite un análisis mucho más sencillo y adecuado del desplazamiento de cada uno de los fragmentos de amplificación, tanto para la técnica de SSR como para la de ISSR.

#### E. Análisis de los patrones genéticos observados mediante el uso de las secuencias microsatélites en ambas generaciones filiales de papaya Maradol.

Los resultados observados en los geles de secuenciación mostrados en el anexo (Figuras 6- 14) no muestran la presencia de ningún tipo de polimorfismo observable en los alelos mediante la amplificación de las secuencias microsatélites utilizadas en este estudio.

Las secuencias microsatélites utilizadas son un pequeño conglomerado de secuencias, recientemente identificadas por el Proyecto del Genoma de la Papaya. Los iniciadores que amplifican para tales secuencias fueron seleccionados debido a su gran parecido en lo referente a su temperatura de anillamiento, al mismo tiempo que cada uno representa un patrón de repetición distinto al anterior. A su vez cada secuencia microsatélite está compuesta por un patrón distinto (dinucleótido, trinucleótido o tetranucleótido) a tal manera de aumentar el grado de astringencia en el reconocimiento de la secuencia.

Al mismo tiempo secuencias de microsatélite muy cortas, como sería una sola repetición (no utilizada en este estudio) o dos repeticiones, pueden considerarse microsatélites que muy probablemente no produzcan polimorfismos; este hecho soporta los recientes descubrimientos realizados por Wang *et al* (2008). De esta manera se utilizó las secuencias con motivos trinucleótidos debido a que que Rae *et al.* (2000) obtuvo evidencias que repeticiones cortas de motivos con trinucleótidos podrían ser altamente polimórficas.

Debido a que en todas las muestras analizadas de ambas generaciones filiales de papaya Maradol pudieron ser amplificadas sus secuencias microsatélites, sin excepción, se concluye que estos SSR no contienen secuencias flanqueantes truncadas, sino altamente conservadas. De esta forma, las secuencias SSR planteadas en este estudio, pudieron ser totalmente amplificadas, aún cuando no se traten de marcadores moleculares beneficiosos.

Se sabe que una gran variedad de microsatélites no son secuencias útiles para observar polimorfismos. Este hecho es afirmado por Wang *et al* (2008), el cual en recientes estudios ha demostrado que la amplificación de secuencias microsatélites en la papaya tiene un éxito del 66.6%, y que los niveles de polimorfismo encontrados son del 17.6%, aun cuando la densidad de secuencias microsatélites es de uno por cada 0.7kb de ADN. Debido a que hasta el momento no se ha realizado ningún tipo de análisis de las secuencias aquí mostradas; se indica en este estudio que las secuencias microsatélites del Cuadro 6, no son secuencias útiles para observar polimorfismos. Se recomienda continuar estudios en los cuales se analice la posibilidad de encontrar marcadores moleculares de microsatélites útiles con el fin de caracterizar la papaya maradol y sus generaciones filiales respectivamente.

Es preciso denotar que Wang y colaboradores (2008) recientemente han observado que secuencias microsatélites que posean motivos tales como: AT, AAT, AG, AAG y ATG (Wang *et al.* 2008), podrían presentar las razones más altas de polimorfismos presentes en papaya. Es preciso denotar que aunque se consideró en este estudio una amplia gama de secuencias SSR, ninguna de las presentes contiene este tipo de motivos. Por esta razón se recomienda analizar la posible variabilidad genética entre ambas generaciones filiales con SSR del tipo polimórficos.

Con respecto a la amplificación dada por cada uno de los iniciadores, se puede observar que toda las secuencias utilizadas, amplifican segmentos del genoma de la papaya; y que esta amplificación suele ser de uno o dos alelos únicamente (iniciadores PM2, PM3, PM4 y PM5). Esto puede indicar la variabilidad de la misma repetición en cada uno de los cromosomas de la papaya Maradol. En cambio la amplificación por medio de los iniciadores PM1 y PM6 señalan que esa repetición se encuentra tres y seis veces respetivamente en los cromosomas de la papaya. La amplia presencia de bandas

observadas tras la amplificación con PM6 (Anexo 18 y 19) podría indicar la presencia de bandas tartamudas, las cuales no son nada más que el producto ocurrido tras el deslizamiento de la Taq polimerasa en el proceso de amplificación.

Por supuesto que la presencia de una gran cantidad de bandas presentes, puede ser adjudicado al hecho, tal como Santos, *et al* (2007) lo ha descrito con anterioridad, que las condiciones desnaturalizantes del tipo de geles utilizados en este estudio (ver en la sección de metodología) no sean lo suficientemente fuertes como para lograr una completa desnaturalización del ADN amplificado. Esto da como resultado la visualización de tres o más bandas. Este hecho, según Santos, *et al*, puede ser superado mediante la utilización de geles que contengan además de urea y acrilamida, formamida; para afinar la claridad y la definición de los alelos presentes. Esto podría indicar la implementación de formamida en la preparación del gel, y no en la administración a las muestras de ADN. Esto permitirá que las muestras estén bajo estricta desnaturalización todo el tiempo durante la corrida del gel.

Es preciso denotar el hecho, que solamente para la amplificación con el iniciador PM6, no se presenten las condiciones desnaturalizantes suficientes. Esto es debido a que para el resto de los iniciadores, exceptuando el PM1, solamente se obtienen una o dos bandas. Con PM1, siendo éste una repetición de tan sólo dos nucleótidos; puede representarse una alta probabilidad de ocurrir varias veces en el genoma de la papaya.

La presencia de dos bandas en la mayoría de los casos indica que la mayoría de los microsatélites utilizados en este estudio, muestran dos distintos alelos para un genotipo. Además que la presencia de una banda (PM3) no indica plenamente un estatus homocigótico, sino mas bien la existencia de un alelo nulo.

Otro aspecto interesante es que el tamaño de los pares de bases amplificados por cada uno de los iniciadores es bastante similar entre los departamentos de Escuintla y Retalhuleu. El hecho, que ambos pares de datos no sean totalmente iguales, se debe a diferencias del desplazamiento de las bandas por el gel electroforético. Debido que el análisis de estas bandas, y su respectivo tamaño se realiza basando la información sobre el marcador molecular de 50pb; es prudente concluir que los juegos de datos no deben ser iguales, y que debido que se encuentran en geles electroforéticos distintos, y por lo tanto

condiciones de corrida distinta, estos no deben ser comparados. Por este hecho, no existen bandas polimórficas entre las poblaciones de Escuintla y Retalhuleu, al mismo tiempo que no existen entre los dos departamentos, aun cuando los tamaños de pares de bases sean distintos.

#### F. Análisis de la heterocigosidad presente en la primera y segunda generación filial de papaya Maradol.

Se ha evaluado la variabilidad genética existente dentro de las poblaciones F1 y F2 de los departamentos de Escuintla y Retalhuleu mediante los estimadores de diversidad, tal como la heterocigosidad. Este medidor proporciona una idea acerca de la riqueza genética contenida dentro de las poblaciones por región, y de la información genética pasada de generación a generación subsecuente.

En el anexo se puede observar una heterocigosidad media para Escuintla de 0.2463, y para Retalhuleu de 0.325. Esto indica que un individuo promedio de la población en general, será heterocigoto en un 24.63% de sus *loci* en Escuintla, y en un 32.50% para Retalhuleu.

Al comparar estos valores de heterocigosidad observada con la esperada, se obtuvo el valor de Chi-cuadrado, mostrado en el mismo Cuadro 25. Los datos indican que aunque la heterocigosidad observada es un poco mayor que la esperada, las poblaciones, según el valor de la prueba estadística, muestran cierta tendencia hacia la heterogeneidad de sus genomas; por lo tanto, aunque el número de muestras no es muy alto, la mayoría de éstas dentro de la población se comportan como heterocigotos.

La variabilidad genética intrapoblacional en plantas ya ha sido revisada con anterioridad en las publicaciones de Hamrick *et al* de 1983 y de Gottlieb en 1981. En estos estudios se observó que existe un gran diferencia entre variabilidad genética, si se trata de una planta autógama o una alógama. Esto se debe a que el sistema de cruzamiento es fundamental y determinante en el flujo génico.

Estos estudios, citados con anterioridad muestran heterocigosidades muy distintas a las encontradas en este trabajo. En cambio, los estudios realizados por Wheller y Guries en

1982 muestran que las heterocigosidades pueden variar dependiendo si se trata de una conífera o una planta herbácea. Los valores de heterocigosidad observados en plantas leñosas es mucho mayor al de las herbáceas. De esta manera el valor promedio de heterocigosidad observado en las plantas de papaya, aun cuando es un poco mayor al observado en plantas tales como *Pinus ponderosa* (H: 0.138) o *Stephanomeria exigua* (H: 0.150), es similar al encontrado para *Picea abies* (H: 0.370).

El alto nivel de variabilidad genética encontrado de la primera a la segunda generación filial, se puede deber a que tal, como Hamrick (1983) propone, a una serie de factores que se sabe están correlacionados con alta heterocigosidad, tales como amplia distribución, alta fecundidad, alogamia y largo tiempo de generación. Todos estos factores encontrados en el proceso de vida de la papaya. En especial la alogamia, siendo la papaya una planta naturalmente dioica (mecanismo de reproducción alogámico), se puede ver favorecida la tendencia a fomentar la variabilidad genética.

A su vez, una heterocigosidad tan alta, no suele estar presente en especies vegetales autóгамas, que dado su sistema de fecundación, presentan valores de heterocigosidad cercanos a cero.

En el Cuadro 26 se muestran las heterocigosidades respectivas de cada una de las generaciones. Este cuadro a su vez es una ampliación del Cuadro 26, en el cual se mostraba el nivel de heterocigosidad global. En el Cuadro 26 se aprecia como los altos niveles de heterocigosidad global son proporcionados en gran parte a la generación F1. En cambio se observa como la F2 mantiene niveles muy bajos de heterocigosidad. Esto demuestra que los niveles de homocigotos en las generaciones F2 aumentan drásticamente, a comparación de los presentes en la F1; y que esto podría ser producto de la reproducción hermafrodita de las F1, ocasionando depresiones en la variabilidad genética y en el vigor híbrido de las plantas de papaya.

Mediante los análisis realizados con el programa TotalLab, fue posible generar dendrogramas que comparan la F1 y F2 por región. Estos dendrogramas se presentan en los anexos 25 a 32. Los dendrogramas presentados se realizaron por dos métodos, el primero por Neighbor joining, y el segundo por máxima parsimonia (UPGMA). Debido a

la naturaleza del estudio, resultó mucho más efectivo el análisis de los dendrogramas UPGMA, que por Neighbor joining. Esto es debido a que UPGMA considera y agrupa las especies relacionadas por similitud genética. En cada dendrograma se muestra la disposición de cada una de las muestras. Las muestras 1 a 15 son parte de la generación F2, y las muestras 16 a 30 parte de la F1. En cada uno de los dendrogramas presentados en la sección de anexo se utilizó en lugar de ADN de papaya, ADN de tomate. Este ADN de tomate fue tratado de la misma manera que el de papaya, a tal manera de obtener la huella dactilar del tomate mediante el uso de los ISSR. Estas muestras fueran tomadas por grupos externos (“outgroups”) para generar el dendrograma en cuestión.

Como se puede observar en los dendrogramas, se muestran tres clados esencialmente. Un primero que agrupa a la gran mayoría de muestras F2 (Clado A). Este clado A se mantiene constante en todos los dendrogramas, denotando una alta similitud genética entre estas muestras. Por otro lado, las muestras F1 suelen estar dispersas en tres clados generalmente (clados B, C y D). Esto indica que existe mayor diversidad genética dentro de la primera generación filial, que en la segunda. Por lo tanto, la heterocigosidad es bastante elevada dentro de la población muestreada. Las plantas pertenecientes a la F2, están llegando a un nivel de equilibrio genético, y muy probablemente mucha de la información genética se esté perdiendo de una generación a la siguiente. Si esta tendencia continuara, la F3 debería encontrarse mucho menos dispersa, y ser más similar genéticamente que la propia F2. Esto podría indicar, que aunque un individuo dentro de la población es 24 o 32% de su *loci* heterocigoto, esta media de heterocigosidad observada se encuentra comprendida en gran parte dentro de la F1 de cada región. Y que la F2 está llegando a un nivel en donde la información genética transmitida de generación en generación está siendo homogénea dentro de toda la población. Al mismo tiempo, la población F2 se encuentra íntimamente relacionada con la F1, genéticamente hablando. Por lo tanto aunque los genes se estén seleccionando para unos cuantos, estos aun transmiten la información adecuada de una generación a la otra.

Las diferencias encontradas en las plantas muestreadas, no son únicamente genotípicas. Fenotípicamente hablando, las plantas muestreadas F1 suelen ser árboles de papaya altos, con las primera hojas de sus brotes dispuestas en la parte superior del árbol. En cambio la

morfología y distribución de las hojas principalmente en las plantas de la F2. En las F2 las hojas suelen salir del tronco principal del árbol, en la región muy cercana al suelo, haciendo que la mayoría de los árboles de la F2 sean árboles mucho más pequeños en estatura que los de la F1. Y aunque aún no se ha observado una diferencia clara con respecto a la morfología, sabor ya características en general del fruto de la F2; no se esperaría que pasara mucho tiempo, antes que comenzaran a observarse cambios significativos.

Al comparar los dendrogramas de las muestras colectadas en el departamento de Escuintla, con ambos iniciadores intermicrosatélites, se puede observar que las muestras 30, 19, 24, 21, 22 y 18 presentan un alto grado de similitud genética. Esto puede ser evidenciado puesto que comparten el mismo clado en ambos dendrogramas. En cambio, en los dendrogramas en los cuales se presenta la distribución genética de las muestras de Retalhuleu, se observa que un número mayor de muestras presentan relación estrecha entre sí; estas muestras son 30, 28, 29, 27, 26, 25, 24, 23, 22 y 21. Este hecho evidencia una íntima relación genética entre los grupos de muestras de la F1, sin que por necesidad todas las muestras analizadas sean genéticamente iguales (comparten en general tres clados).

Con respecto a los dendrogramas obtenidos mediante el método de Neighbor joining, se observa en esencia la misma distribución que la obtenida por el método UPGMA. En ésta, las muestras de la F2 se encuentran íntimamente relacionadas, en tanto que las de la F1 se encuentran contenidas en varios clados. Pero este tipo de dendrograma sólo permite observar y remarcar las posibles diferencias genéticas contenidas en cada una de las muestras. Aún así este tipo de dendrograma resulta interesante debido a que muestra qué tan diferentes genéticamente son las muestras. Esto se puede observar al medir la longitud o la distancia marcada por cada una de las ramificaciones en cada clado. Como se observa, en general las muestras de la generación F2 se están agrupando en clados muy cercanos; en tanto las muestras de la generación F1, mantienen una agrupación variada, compartiendo en algunos casos uno o dos clados. En resumen, esta información es consistente, con que la variabilidad genética de las muestras se está perdiendo de una generación a la siguiente. Este hecho es probable debido a que los árboles en las fincas son seleccionados por los agricultores. Solamente los mejores árboles, los más productivos o los que sean

sexualmente correctos, serán elegidos para continuar la cosecha posterior. De esta manera se está procediendo a seleccionar cierto grupo de genes que se moverán dentro de la población (F1), la cual dará posterior origen a la F2. Esto indica en conjunto que el grado de variabilidad genética dentro de la población es muy alto (alta heterocigosidad), y que algunas plantas aun son muy similares genéticamente a las F1. Los clados en la distribución general, entre la F1 y la F2 no son genéticamente muy distantes, aunque debido a selección al momento de la cosecha, se está eligiendo a cierto grupo de genes de la generación F1, que son los que circulan preferentemente en la generación F2.

La información obtenida mediante la prueba de Hardy Weinberg indica que ninguna de las poblaciones se encuentra en equilibrio (Anexo 28). Esto es consistente con los valores encontrados para la heterocigosidad. Por lo tanto, tras un apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual de la población de papaya Maradol, no se fija en un valor de equilibrio particular. Esto se puede deber a que las plantas dentro de la población son seleccionadas por los agricultores, como ya antes se ha mencionado, promoviendo alteraciones en la composición genética de la población.

#### G. Dinámica del índice de fijación ( $F_{st}$ ) entre la población F1 y F2 de papaya Maradol.

Se sabe que valores de 0.05 de índice de fijación son el resultado de una diferencia genética negligente dentro de la población; por otro lado valores superiores a 0.25 indican una gran diferencia genética. Los resultados obtenidos de índice de fijación mostrados en el Cuadro 32, muestran valores de  $F_{st}$  de 0.137 y 0.139. estos datos son consistentes con una diferenciación genética notable dentro de la F1 y F2; aun cuando al parecer esta diferencia no es completa, como para generar una amplia subdivisión. De esta manera, los resultados son concordantes con los obtenidos mediante la heterocigosidad; en la cual la población F2 se encuentra subdividiendo en un solo grupo.

#### H. Índices de similitud dentro de la población de papaya Maradol.

Los resultados obtenidos y mostrados en el Cuadro 31, muestran los índices de similitud promedio. La similitud promedio entre los genotipos de la F1 mostró un

agrupamiento escaso, puesto que sus valores se encuentran en el rango de 0.400. Este hecho puede ser a su vez observado en los dendrogramas antes mencionados, donde el grupo de las F1, se encuentra distribuido en varios clados. En cambio, las muestras pertenecientes al grupo F2, muestran valores mucho más elevados de similitud entre ellas. Lo cual podría indicar, como ya antes se mencionó, cierta tendencia por parte de las F2, a poseer genotipos bastante similares. A su vez en los valores de similitud entre las F1 y F2 (general de la población) muestran valores cercanos al 0.3700; este resultado podría estar afectado por la población F1, haciendo que la similitud entre toda la población sea bastante baja. Resultados similares se obtuvieron en el estudio del Análisis de la diversidad *Eucalyptus grandis*, donde el índice de similitud obtenido fue de 0.452, aun cuando las muestras analizadas se trataban de genotipos medio-hermanos.

#### I. Efectos de la endogamia y pérdida del vigor híbrido dentro de la población de papaya Maradol.

Se sabe que el gran porcentaje de papayas Maradol hermafroditas, presentes en la población, promueve la autofertilización y por ende la endogamia. Este evento es concordante con el hecho que ocurra un incremento sustancial en el número de homocigotos dentro de la población F2, en comparación con la F1. Esto no solo se observa de manera genética, sino como anteriormente se ha mencionado, de manera fenotípica por igual.

La endogamia suele hacer decrecer el efecto de la heterosis en los organismos. Como es bien conocido, la papaya Maradol es un híbrido, en el cual se han fijado una serie de genes que en combinación, hacen de esta papaya un organismo mucho más eficiente para los agricultores, que la utilización de los antecesores genéticos de esta variedad.

El uso de semillas F2 en las poblaciones, y su aislamiento de otros tipos de variedades y de plantas, puede haber generado un aislamiento genético aun mayor que el esperado con la pérdida del vigor híbrido de una generación a la siguiente.

Los datos obtenidos demuestran que la endogamia ocurrida puede haber generado una sobreexpresión de genes recesivos, que normalmente no se esperarían. Como resultado se

está observando dentro de la población F2, en comparación con la F1, rasgos típicos de la endogamia, tales como reducción en la fertilidad de las plantas, disminución en el tamaño de un adulto normal, decaimiento en las razones de crecimiento y menores tasas de generaciones de brotes (nacimiento de nuevas plántulas).

## IV. CONCLUSIONES

Se encontró que las seis secuencias microsatélites, diseñadas por la Universidad de Hawaii en Manoa, en el Proyecto del Genoma de la papaya, son marcadores moleculares no polimórficos para la papaya Maradol.

Al mismo tiempo, los iniciadores IPM1 ((CAT)(GCA)(CAT)(TG)<sub>7</sub>Y) e IPM2 ((GCT)(AGT)(GCT)(CA)<sub>7</sub>Y) que amplifican secuencias intermicrosatélites en varias especies de plantas, diferentes a la papaya, son marcadores moleculares polimórficos efectivos para comparar variabilidad genética entre las población de papayas Maradol de Guatemala.

El análisis mediante el uso de estos dos intermicrosatélites demostró que existe una alta heterocigosidad entre la primera y la segunda generación filial de plantas de papaya Maradol sembradas en Guatemala. Por lo que genéticamente no resulta rentable para los agricultores de Guatemala utilizar las semillas producto de la primera cosecha, para producir una segunda siembra. Esto es debido a que las características genéticas de la papaya obtenida, habrán variado significativamente.

## V. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar analizando las secuencias microsatélites restantes, encontradas por el Proyecto del Genoma de la Papaya; con el fin de encontrar marcadores moleculares útiles para medir el grado de polimorfismo en el cultivo de papaya.

A su vez se denota que debido a trabajos recientemente publicados, los motivos que probablemente presenten los mayores grados de polimórficos son AT, AG y ATG; por lo que se recomienda centrar la investigación en este tipo de motivos.

Al mismo tiempo se promueve a continuar analizando las siguientes generaciones filiales de semillas (F3, F4, F5, etc), con el fin de observar un posible aumento en la heterocigosidad de la población de papaya Maradol no certificada.

## VI. REFERENCIAS

Ávalos, Andrés. 2004. *Caracterización de 20 variedades de mutantes de frijol (Phaseolus vulgaris L.) mediante la técnica de AFLP*. Tesis para optar al grado de Bioquímico. Universidad del Valle de Guatemala. 96 pp.

Awise, John; A. Power, y D. Walker. 2004. *Genetic sex determination, gender identification and pseudohermaphroditism in the knobbed whelk, Busycon carica (Mollusca: Melongenidae)*. The Royal Society. 271 : 641-646.

Azofeifa-Delgado, Álvaro. 2006. *Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico*. Revista Agronomía Mesoamericana. 17 (2): 221-242.

Awasthi, Arvind, et al. 2004. *Genetic diversity and relationships in mulberry (genus Morus) as revealed by RAPD and ISSR marker assays*. BMC Genetics. 5(1):1-9.

Balestre, M. et al. 2008. *Genetic distance estimates among single cross hybrids and correlation with specific combining ability and yield in corn double cross hybrids*. Genetic and Molecular Research. 7(1): 65-73.

Bento, Miguel, et al. 2008. *Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in Triticale*. Jornal Plos one. 3 (1):

Bonamico, N, et al. 2004. *Caracterización y clasificación de Híbridos simples de maíz con marcadores SSR*. INTA. Argentina. 33 (2):129-144.

Bornet Benjamin y Branchard Miel. 2001. *Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting*. Plant Molecular Biology Reporter 19 (122): 209-215.

Bornet Benjamin, *et al.* 2004. *ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton*. *Journal of Apply Phycology*. 16 (4): 285-290.

Chen, Cuixia, *et al.* 2007. *Construction of a Sequence-Tagged High-Density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in Brassicales*. *Genetics Society of America*. 177: 2481-2491.

Constantini, Laura, *et al.* 2008. *Berry and phenology-related traits in grapevine (Vitis vinifera L.): From Quantitative Trait Loci to underlying genes*. *BMC Plant Biology*. 8 (38): 1-17.

Damodar, K, *et al.*1999. *Microsatellite in the silkworm, Bombyx mori: Abundance, polymorphism, and strain characterization*. *Genome. Canada*. 42: 1057-1065.

Escobar, B. 2000. *Cultivo de la papaya, pulgones transmisores de virus. Proyecto de Desarrollo de la Fructicultura y Agroindustria*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA). Guatemala.

Ewens, Warren. 2000. *Mathematical population genetics. Theoretical Introduction*. 2a edición. Filadelfia. 417págs.

FAOSTAT Data base. 2007. Food and Agriculture organization (FAO). Organización de las Naciones Unidas.

Freitas, F.O., Moretzsohn, M.C. y Valls, J.F.M. 2007. *Genetic variability of Brazilian Indian landraces of Arachis hypogaea L*. *Genetic and Molecular Research*. 6 (3): 675-684.

González A, *et al.* 2005. *Assessment of Inter Simple Sequence Repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean*. *Crop Science, Society of America*. 45 : 606-615.

Guo, Wen-Jiu, *et al.* 2007. *Significant Comparative Characteristics between Orphan and Nonorphan Genes in the Rice (Oryza sativa L.) Genome*. Hindawi Publishing Corporation. ID 21676.7. :1-7.

Gupta, Sarika, *et al.* 2007. *Construction of genetic linkage map of the medicinal and ornamental plant Cathranthus roseus*. Indian Academy of Science. Journal of Genetics. 86 (3):259-268.

Hakki, Erdogan, *et al.* 2007. *Inter Simple Sequence Repeats separate efficiently hemp from marijuana (Cannabis sativa L.)*. Electronic Journal of Biotechnology. Chile. 10 (4): 570-581.

Hao, Ma, *et al.* 2004. *High-Density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in Papaya*. Genetics Society of America. Hawaii. 166: 419-436.

Hartl, D.L. 1988. *A primer of Population Genetics*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Sinauer associates. USA. 27-70 págs.

Hayden, Matthew, *et al.* 2008. *Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping*. BMC Genomics. 9 (80) :1-12.

Hendre, Prasad, *et al.* 2008. *Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (Coffea canephora Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies*. BMC Plant Biology. 8(51): 1-19.

IAEA. 2002. *Mutant Germoplasm Characterization Using Molecular Markers. A manual*. International Atomic Energy Agency. Viena. 87pp.

Ibar, Leandro. 1986. *Cultivo del Aguacate, Chirimoyo, Mango y Papaya*. Técnicas agropecuarias. 3 edición. Barcelona. Editorial Aedos. 171 págs.

Jiu-Guo, Wen; Ping, Li y Shao-Ping Ye. 2007. *Significant Comparative Characteristics between Orphan and Nonorphan Genes in the Rice (Oryza sativa L.) Genome*. Comparative and Functional Genomics. Hindawi Publishing Corporation. 21(1): 1-7

Karp, A y Edwards, K. 1998. *DNA markers: a global overview*. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Gresshoff. New York. 343 págs.

Keer, P, et al. 2008. *Plant tribes: A gene and gene family resource for comparative genomics in plants*. Nucleic Acids Research. 36: 971-976.

Krische, Mary. 2004. *Desarrollo de una técnica costo efectiva para la identificación y caracterización automatizada de microsatélites aplicada en Triatoma diminuta*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 148 págs.

Kuang, Hanhui, et al. 2007. *Evolution and Genetic Population Structure of Prickly Lettuce (Lactuca serriola) and Its RGC2 Resistance Gene Cluster*. Genetic Society of America. 178: 1547-1558.

Kyndt, T. et al. 2006. *Cross-species microsatellite amplification in Vasconcellea and related genera and their use in germplasm classification*. NRC. Genome. Canada. 49: 786-798.

Liu, Bao y Wendel, Jonathan. 2001. *Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as genetic marker system in cotton*. Molecular Ecology. Estados Unidos. 1: 205-208.

Luro, Francois, et al. 2008. *Transferability of the EST-SSRs developed on Nules Clementine (Citrus clementina Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping*. BMC Genomics. 9(287): 1-13.

Ma, Hao, *et al.* 2004. *High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in Papaya*. Genetics Society of America. 166:419-436.

Martinez, Eliseo. 2007. Biometría. Universidad de Antofagasta. El modelo de Probabilidad para la frecuencia alélica. <http://www.uantof.cl/facultades/csbasicas/Matematicas/academicos/emartinez/biomat/biomat.html>

Martinez, León. 2006. *Reconstrucción de la historia del cambio de los caracteres*. Capitulo 4. Modelos evolutivos.

Mason, S. *et al.* 2005. *Development and Use of Microsatellite Markers for Germplasm Characterization in Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*. Crop Science Society of America. 45:1618- 1630.

Mathias, Mónica, *et al.* 2007. *Uso de marcadores SSR para la identificación de Germoplasma de Papa en el Programa de Mejoramiento de INIA de Chile*. Agricultura Técnica. 67 (1):3-15

Maia, Luciano, *et al.* 2008. *SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation*. International Journal of Plant Genomics. Hindawi Publishing Corporation. 12(2): 1-9.

Mackay, John; Wright, Christopher y Bonfiglioli, Roderick. 2008. *A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars*. Plant Methods. 4 (8): 1-10.

Ming, Ray, *et al.* 2008. *The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (Carica papaya Linnaeus)*. Nature. 452: 991-997.

Monterroso Gil de Cáseres, Maria Eugenia. 2007. PROFUTA: *Desarrollo actual de la papaya en Guatemala*. Base de datos.

Mora, Eric y Bogantes, Antonio. 2005. *Estudio de una mutación en Papaya (Carica papaya L.) que produce letalidad de plantas femeninas*. Agronomía Mesoamericana. 16 (1): 86-94.

Morales, Marcelino. 2002. *Caracterización genotípica de plantas de maíz (Zea mays L.) utilizando secuencias microsatélites distribuidas uniformemente sobre el genoma*. Tesis de la Universidad de Belgrano. Buenos Aires. 34 págs.

Mudunuri, Suresh y Nagarajaram, Hampapathalu. 2007. *IMEx: Imperfect Microsatellite Extractor*. Oxford University Press. 23 (10): 1181-1187.

PBSEL, Papaya BAC-end sequence library. 2008. Universidad de Hawaii en Manoa. Departamento de biociencias moleculares y bioingeniería. <http://genomics.hawaii.edu/papaya/BES/>, última visita en 2008.

PROFRUTA. 2000. *Manual del cultivo de la papaya*. Proyecto de Desarrollo de la Fructicultura y Agroindustria. Guatemala.

Oficina de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. 2007. Directrices para los perfiles de AND: selección de marcadores moleculares y creación de una base de datos (Directrices BMT). Ginebra. Proyecto No 9. 19 págs. Página de Internte: `orgupov\shared\document\bmt\_bmt_guidelines\upovdrafts\bmt_guidelines_proj_9_s.doc`.

Ornella, L, et al. 1997. *Empleo de marcadores moleculares de ADN para identificar genotipos de maíz (Zea mays L.)*. Argentina. 3(18): 1-9.

Pérez-Campos, S, et al. 2007. *Caracterización pomológica del almendro (Prunus amigdalus Batsch) en materiales autóctonos del Elche de la Sierra (Albacete)*. Actas de Horticultura. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. XI Congreso SECH. 48:430-433.

Rae, S, J. *et al.* 2000. *Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (Beta vulgaris spp.)*. Applied Genetics. 100:1240–1248.

Raina, S.N., *et al.* 2001. *RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species*. Genome. Canada. 44: 763-772.

Rangel, P.N., *et al.* 2008. *Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross Oryza sativa (BG90-2) x Oryza glumaepatula (RS-16)*. Genetics and Molecular Research. 7(1): 184-195.

Rivera, Emiliana. 2003. *Identificación y caracterización de microsatélites polimórficos en Trypanosoma cruzi*. Universidad del Valle de Guatemala. Biblioteca de la Universidad del Valle. 163 págs.

Santos A.C., *et al.* (1999). *Variability in the interpretation of microsatellite patterns with different electrophoretic conditions*. Clin Pathol: Mol Pathol. 52(5): 302–304

Sud, Suman, *et al.* 2005. *Genetic relationships among wheat genotypes, as revealed by microsatellite markers and pedigree analysis*. Apply Genetics. 46 (4): 375-379.

Stupar, R. *et al.* 2008. *Gene expression analyses in maize inbreds and hybrids with varying levels of heterosis*. BMC plant biology. 8(33): 1- 19.

Tabachnick, W.J. y W.C Black IV. 1996. *Population genetics in vector biology*. The Biology of disease vectors. University Press of Colorado. USA. Pp 417-437.

Tung, Chung-Jui, *et al.* 2003. *Manual del Cultivo de la papaya*. Ministerio de Agricultura , Ganadería y Alimentación (MAGA). 81 págs.

Ueno, Saneyoshi; Taguchi, Yuriko y Tsumura, Yoshihiko. 2008. *Microsatellite markers derived from Quercus mongolica var. crispula (Fagaceae) inner bark expressed sequence tags*. Genes Genetics. 83: 179-187.

Universidad de Hawaii en Manoa. 2008. The Hawaii Papaya Genome Project. <http://asgpb.mhpcc.hawaii.edu/papaya/>

Wallace, Bruce. 1981. *Basic population genetics*. Nueva York. Columbia University Press. 688 págs.

Walker, D, et al. 2005. *Sex-linked Markers Facilitate Genetic Parentage Analyses in Knobbed Whelk Broods*. Journal of Heredity. 96 (2): 108-113.

Wang, Jianping, et al. 2008. *Genome wide comparative analyses of microsatellites in Papaya*. Tropical Plant Biology. 1: 278-292.

Weising, Kurt, Atkinson, Ross y Gardner, Richard. 2008. *Genomic Fingerprinting by Microsatellite-primed PCR: A Critical Evaluation*. Genome Research. 4: 249-255.

Yu, K, et al. 2000. *Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. The American Genetic Association. The Journal of Heredity. 91(6):429-434.

Zhuang, Y, et al. 2007. *Extensive Allelic Variation in Gene Expression in Populus F1 Hybrids*. Genetic Society of America. 177: 1987- 1996.

## VII. ANEXO

CUADRO 18: Absorbancias a 260, 280 y 320 nm, razón A260/A280 y concentración de muestras obtenidas a partir del método de extracción de ADN.

Generación filial, locación	Número de muestra	A 260	A 280	A 320	Pureza	Concentración ng/ul
Maradol F1, Escuintla	1	0.017	0.014	0.009	1.60	248.8
	2	0.013	0.009	0.005	2.00	248.8
	3	0.016	0.013	0.009	1.75	217.7
	4	0.036	0.028	0.019	1.89	273.7
	5	0.034	0.029	0.02	1.56	435.4
	6	0.018	0.014	0.01	2.00	248.8
	7	0.04	0.031	0.02	1.82	222.0
	8	0.011	0.008	0.006	2.50	155.5
	9	0.044	0.035	0.025	1.90	305.9
	10	0.045	0.037	0.026	1.73	305.9
	11	0.022	0.017	0.016	1.60	186.6
	12	0.052	0.043	0.031	1.75	338.1
	13	0.013	0.01	0.006	1.75	217.7
	14	0.02	0.015	0.01	2.00	311.0
	15	0.044	0.033	0.022	2.00	354.2
Maradol F2, Escuintla	16	0.04	0.031	0.022	2.00	289.8
	17	0.052	0.041	0.029	1.92	255.3
	18	0.041	0.033	0.023	1.80	289.8
	19	0.014	0.011	0.007	1.75	217.7
	20	0.031	0.025	0.018	1.86	209.3
	21	0.06	0.05	0.036	1.71	386.4
	22	0.029	0.024	0.016	1.63	209.3
	23	0.038	0.033	0.023	1.5	241.5
	24	0.066	0.058	0.044	1.57	354.2
	25	0.027	0.023	0.017	1.67	311
	26	0.022	0.02	0.015	1.4	217.7

Continuación Cuadro 18.

<b>Generación filial, locación</b>	<b>Número de muestra</b>	<b>A 260</b>	<b>A 280</b>	<b>A 320</b>	<b>Pureza</b>	<b>Concentración ng/ul</b>
Maradol F2, Escuintla	28	0.059	0.046	0.029	1.76	333
	29	0.04	0.035	0.028	1.71	373.2
	30	0.022	0.019	0.013	1.5	279.9
Maradol F1, Retalhuleu	31	0.037	0.032	0.024	1.63	274.3
	32	0.02	0.016	0.012	2	248.8
	33	0.025	0.02	0.014	1.83	342.1
	34	0.016	0.013	0.01	2	186.6
	35	0.04	0.031	0.022	2	289.8
	36	0.052	0.041	0.029	1.92	255.3
	37	0.041	0.033	0.023	1.8	289.8
	38	0.014	0.011	0.007	1.75	217.7
	39	0.031	0.025	0.018	1.86	339.3
	40	0.06	0.05	0.036	1.71	386.4
	41	0.018	0.014	0.01	2	248.8
	42	0.04	0.031	0.02	1.82	322
	43	0.011	0.008	0.006	2.5	155.5
	44	0.04	0.031	0.022	2	379.8
	45	0.052	0.041	0.029	1.92	370.3
Maradol F2, Retalhuleu	46	0.041	0.033	0.023	1.8	289.8
	47	0.014	0.011	0.007	1.75	217.7
	48	0.031	0.025	0.018	1.86	209.3
	49	0.06	0.05	0.036	1.71	266.4
	50	0.06	0.052	0.036	1.5	266.4
	51	0.029	0.024	0.02	2.25	279.9
	52	0.088	0.078	0.05	1.36	231.8
	53	0.068	0.066	0.061	1.4	217.7
	54	0.01	0.007	0.002	1.6	248.8
	55	0.038	0.032	0.015	1.35	370.3
	56	0.015	0.012	0.004	1.38	342.1

Continuación Cuadro 18.

Generación Filial, locación	Número de muestra	A			Pureza	Concentración ng/ul
		A 260	A 280	320		
	58	0.012	0.01	0.006	1.5	186.6
	59	0.019	0.014	0.008	1.83	342.1
	60	0.068	0.066	0.061	1.4	217.7

CUADRO 19: Programas de PCR utilizados para la amplificación de SSR en papaya.

A.			B.		
Paso	Tiempo	Temperatura	Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 minutos	94°C	1	5 minutos	94°C
2	45 segundos	94°C	2	45 segundos	94°C
3	1 minuto	56°C	3	1 minuto	58°C
4	1 minutos	72°C	4	1 minutos	72°C
5	Repetir paso 2 al 4, 40 veces	-	5	Repetir paso 2 al 4, 40 veces	-
6	7 minutos	72°C	6	7 minutos	72°C
7	indefinido	4°C	7	indefinido	4°C

C.			D.		
Paso	Tiempo	Temperatura	Paso	Tiempo	Temperatura
1	7 minutos	94°C	1	5 minutos	94°C
2	45 segundos	94°C	2	1 minuto	94°C
3	1 minuto	56°C	3	1 minuto	56°C
4	1 minutos	72°C	4	1 minutos	72°C
5	Repetir paso 2 al 4, 40 veces	-	5	Repetir paso 2 al 4, 30 veces	-

Continuación Cuadro 19.

C.			D.		
Paso	Tiempo	Temperatura	Paso	Tiempo	Temperatura
6	30 segundos	72°C	6	3 minutos	72°C
7	indefinido	4°C	7	indefinido	4°C

CUADRO 20: Protocolos de PCR con distintas concentraciones finales de reactivos para la amplificación de SSR.

Protocolo A		Protocolo B	
Tampón	1X	Tampón	1X
MgCl <sub>2</sub>	1mM	MgCl <sub>2</sub>	2mM
dNTP's	1.0mM	dNTP's	2.5mM
	c/u		c/u
Primer F	0.3uM	Iniciador F	0.1uM
Primer R	0.3uM	Iniciador R	0.1uM
Taq polimerasa	1 U/ul	Taq polimerasa	0.5 U/ul
ADN	25ng	ADN	25ng
Volumen	20ul	Volumen	20ul
Total		Total	

Anexo. Secuencia producto de amplificación del iniciador PM1 de microsatélites. Las secuencias subrayadas indican la localización de los respectivos iniciadores. La secuencia en gris pálido indica al codón de iniciación. La secuencia en itálica indica secuencia de lectura abierta, en tanto la sección en negrilla indica al codón de finalización.

5'-  
CATGCAGACC CAAAAACAAA AACAGTAATA ATAATAATAA TAATAATA

AT AGTTTGGTGG ACTGCCCAGA ACCTCATCTC ACAGCATCAA AGTTCTA  
AAT TAAAAGGC ATG **GGCAAGACG** **ATGAGAAGCA** A -3'

Secuencia producto de amplificación del iniciador PM2 de microsatélites

5'-  
AGATTCACCC ACTTGCATCC ACAAACAGAC ACCATG**AAGA TTTGGCTCTT**  
**CCTATGGAGG ACCAAGACA GAAACAACA CAACAACAAC ACAAACAAA AA**  
**GTGAAAGA GAAAAGAGAA AGGAGAAAAA AAAAAAAGA AAAGAGAG**  
AT GGAGACTGGG ACACACC -3'

Secuencia producto de amplificación del iniciador PM3 de microsatélites

5'-  
CTTGCCGCTT CTTCTTTGTC GCTTGATATT TGCATTTGCT GCTGCTTCAC G  
CACTACTTC TGCTACTTTT TATCACCCC TTTCTTCTTC TTCTTCTTCTTCT  
TTTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTTCAAC TGCTCTCTTT GTTTCCGGCT **CATGC**  
**ATTG TTCTCATGT GGTGGGTAC TTGGGC** TGAT TAAGAATCCATCGCGT  
TTTT G -3'

Secuencia producto de amplificación del iniciador PM4 de microsatélites

5'-  
CCATCCATTG TAATG **TGGCA CTGCAGTATG ATCTATCAGT GTAATATGCA**  
**TACATACATA CACACATATC ACACATACAC AGTTCATAAT CTTTC** TAGTT  
ATTTGTGTCT ATTTCTTTAT TTTAATCTT TTTACTCTTC TTTTAAGTG G  
CAATGATCT TGAGGTCTTA GTGTTGAGCC CTGGGTGGAG TAACCAATGA  
GGGCTCTTGT AGTGTTCATG GCAACTGGAT GGACACTCTA ACTGTGCCAT  
GTATGGCTCT AAAGAATAGG TGCCGTCCCT TCTTTTCAA TAAGCTTTGA  
GCTTGTTCCT TTGC -3'

Secuencia producto de amplificación del iniciador PM5 de microsatélites

5'-  
CCAAACCTGG GCATTAGAAA AAAAAAAG GTCAAAATGA TATTGTTTT  
A TGAAACCTCA AAATGATATG ATTTTGAATA TTAAGAAAAG AAAATAG  
AGG CATATGATAC GATTTTGAAT ATTAAGAAAA GAAAATAGAG GCGTG  
TATG**C CTCTAAAACC CNNNGAAGAN NNNGAACTCT TTTCCNNTCA NNNT**  
**ATAANN NAAGAAGAGA GAGTNNNA AGAAGNNNGT TGTGCGAAGA G**  
**ATAGAAGAG ATCTGAGCAG AGAGAGAGAA AGAGAAAGAA ANNNAGAGA**  
G GAGGTTACGG CNNNNNNATC AACAGCGTAG AGNNNNGAAA TAGAAA

AAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAA AAGAATAAGA ATGAGATGAA GA  
 ACAAGAAA CTGGTGCTTC NNNNNNACGN NNNGACTNNN NNAGAAGAGG  
 GACTGTGTGC GACGGCCTTG TCTGGAGAAA AAACGTTGAT TTACGCATG  
 G ATGTCAGTTT ACG -3'

Secuencia producto de amplificación del iniciador PM6 de microsatélites

5'-

ACTCATCGTC ATCTCACCCC CCAGCTCTCC AGACAGGTCA ATCATCAATC  
 ATCAATCAAT CAATCAATCA ATCAATCAAT CAATTCTATA TCAATCGAC  
 T AATTTAGGTA GGTTTCTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTCA ATTTTGTGGC  
 ATGGAACAGG TGATACGAG CGATTTTCAGG GTGCAGGANN NNNNNNNN  
 NN NATTTGGAGGA AGAGAACAGA GCACTGATGG NNNNNNNNAT CCAA  
 CGCTG CCGTTGCGTT TNNNNNAGNA GNNNCAATG GAATCAAAGC TCA  
ACGG -3'

CUADRO 21: Cantidad y longitud de bandas obtenidas tras amplificación por tipo de microsatélite.

Tipo SSR	Motivo	No. Bandas	Departamentos		Tamaño de bandas (pb)
			Escuintla	Retalhuleu	
PM1	TAA	3	272	247	
			163	170	
			134	136	
PM2	AAC	2	201	198	
			169	164	
PM3	TTC	1	75	82	
PM4	CATA	2	311	322	
			237	225	
PM5	AAG	2	975	898	
			488	528	
PM6	ATCA	5	523	520	
			351	339	
			310	297	
			290	275	
			277	261	

Figura 7: Gel de secuenciación donde se muestra la amplificación de una muestra de papaya maradol F2 y F1 con el iniciador PM1, PM2 y PM3. E: Escalera 50pb. 1,2,6,9 : muestra de papaya maradol F2. 3, 4, 7, 10, 11: muestra de papaya maradol F1. 5, 8, 12: muestra de papaya hawaiana.

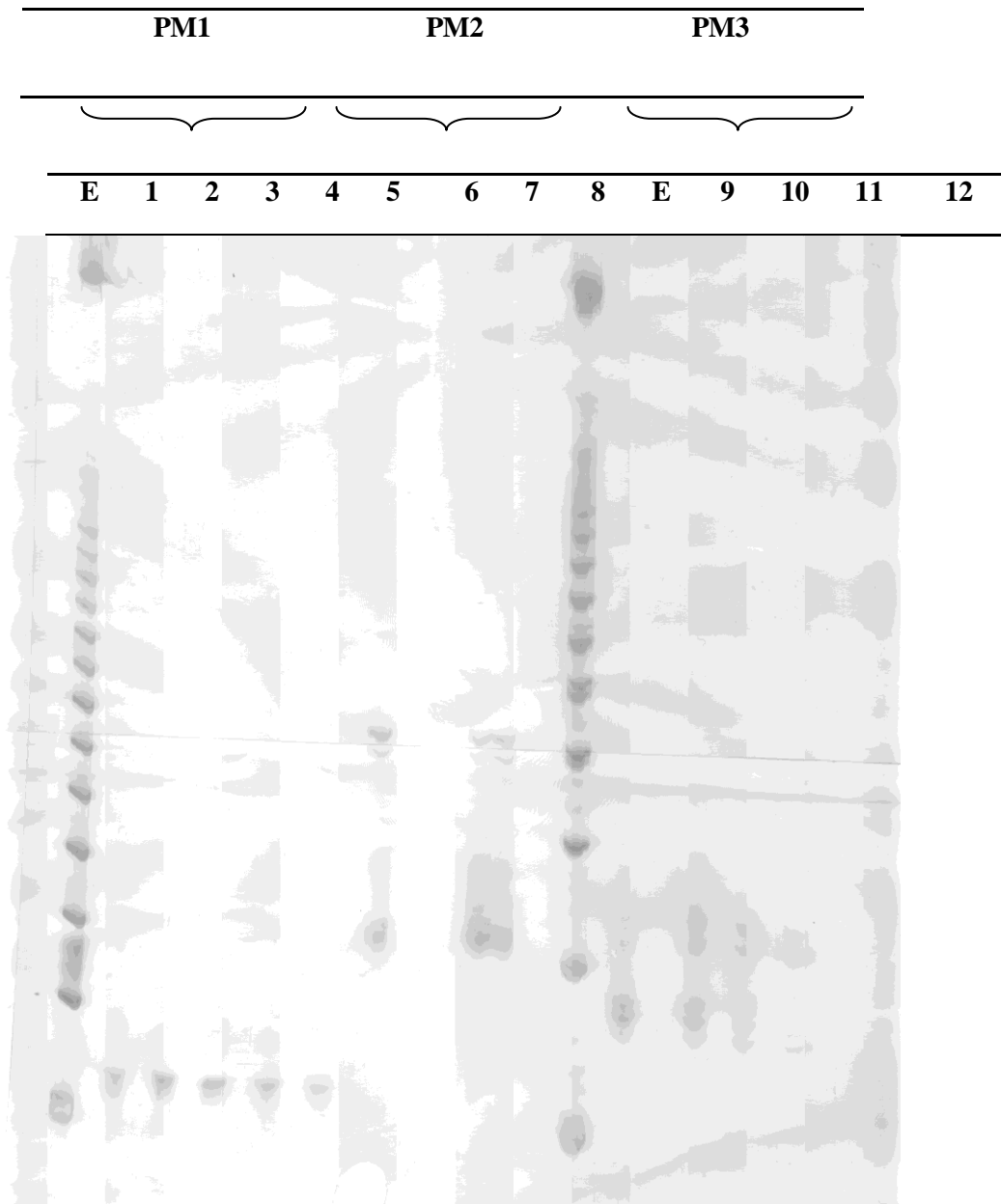


Figura 8: Gel de secuenciación donde se muestra la amplificación de una muestra de papaya maradol F2 y F1 y muestras de papaya hawaiana, con el iniciador PM4, PM5. E: escalera de 50pb. 1,5, 7: muestra de papaya maradol F2. 2, 3, 6, 8: Muestras de papaya maradol F1.4, 9: Muestras de papaya hawaiana.

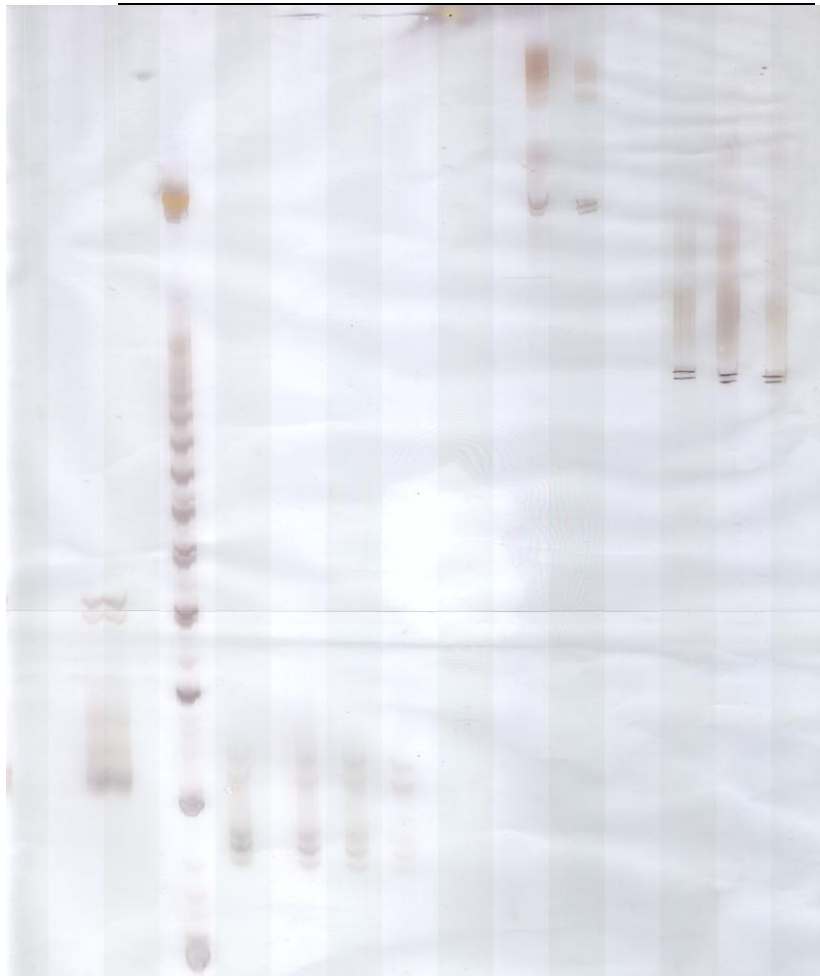
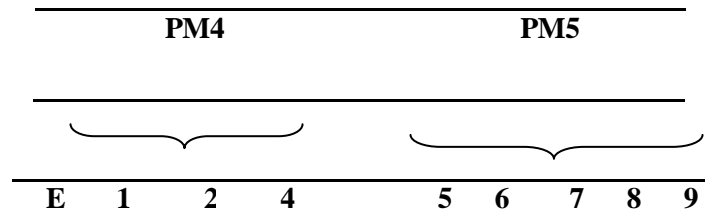


Figura 9: Gel de secuenciación microsatélite PM1, de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2. E: Escalera de 50pb.

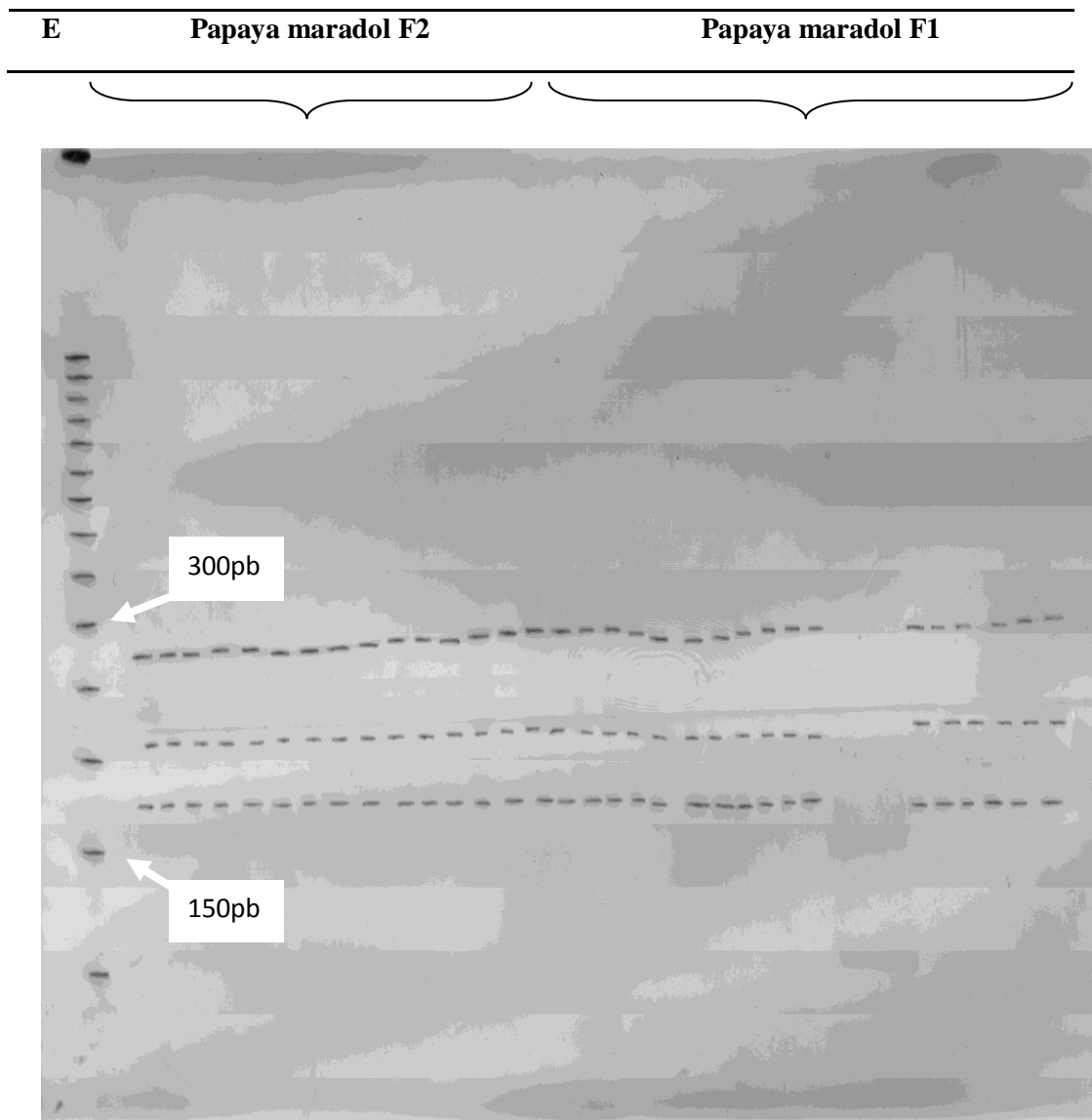


Figura 10: Gel de secuenciación microsatélite PM3 de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2. E: Escalera de 50pb.

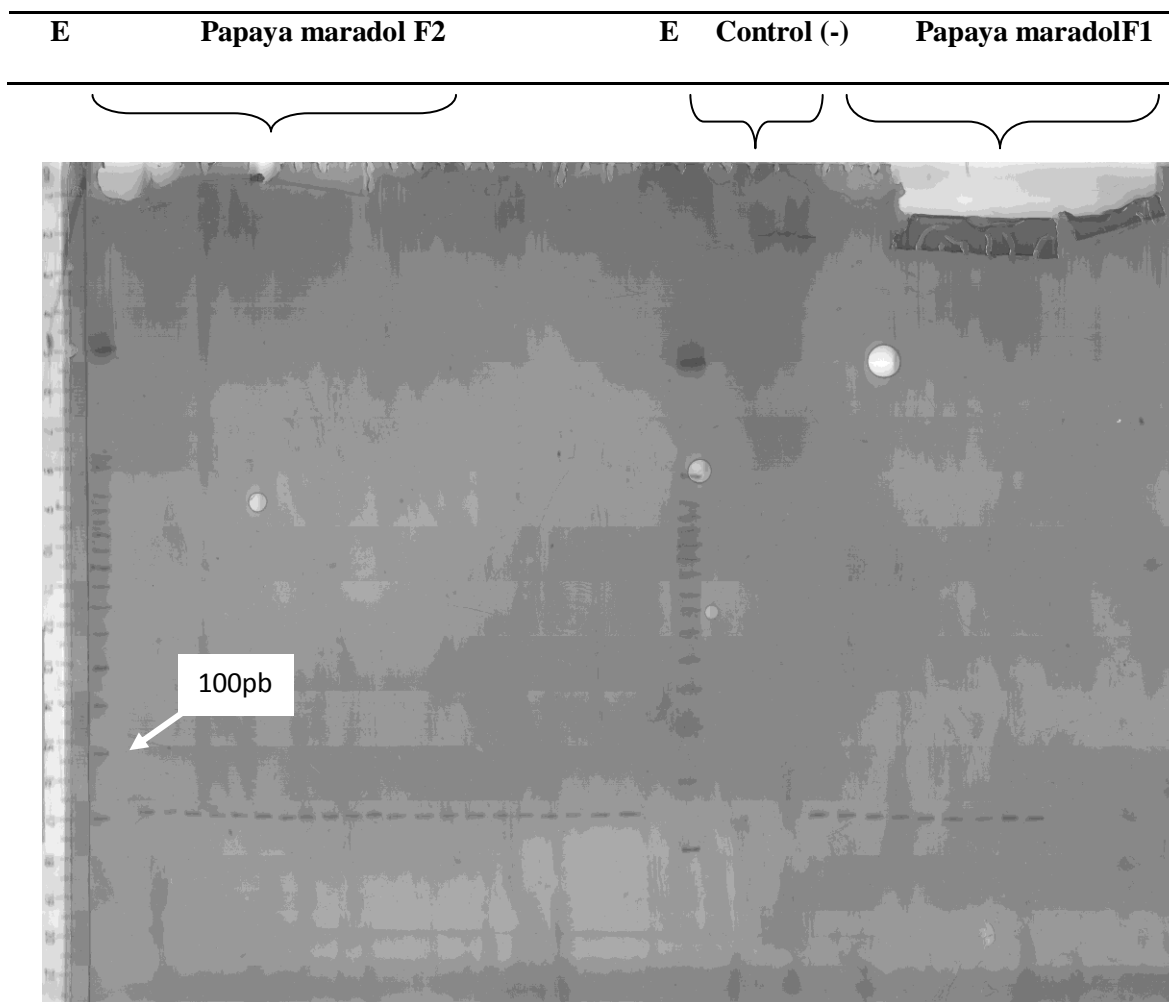


Figura 11: Gel de secuenciación microsatélite PM5 de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2. E: Escalera de 50pb.

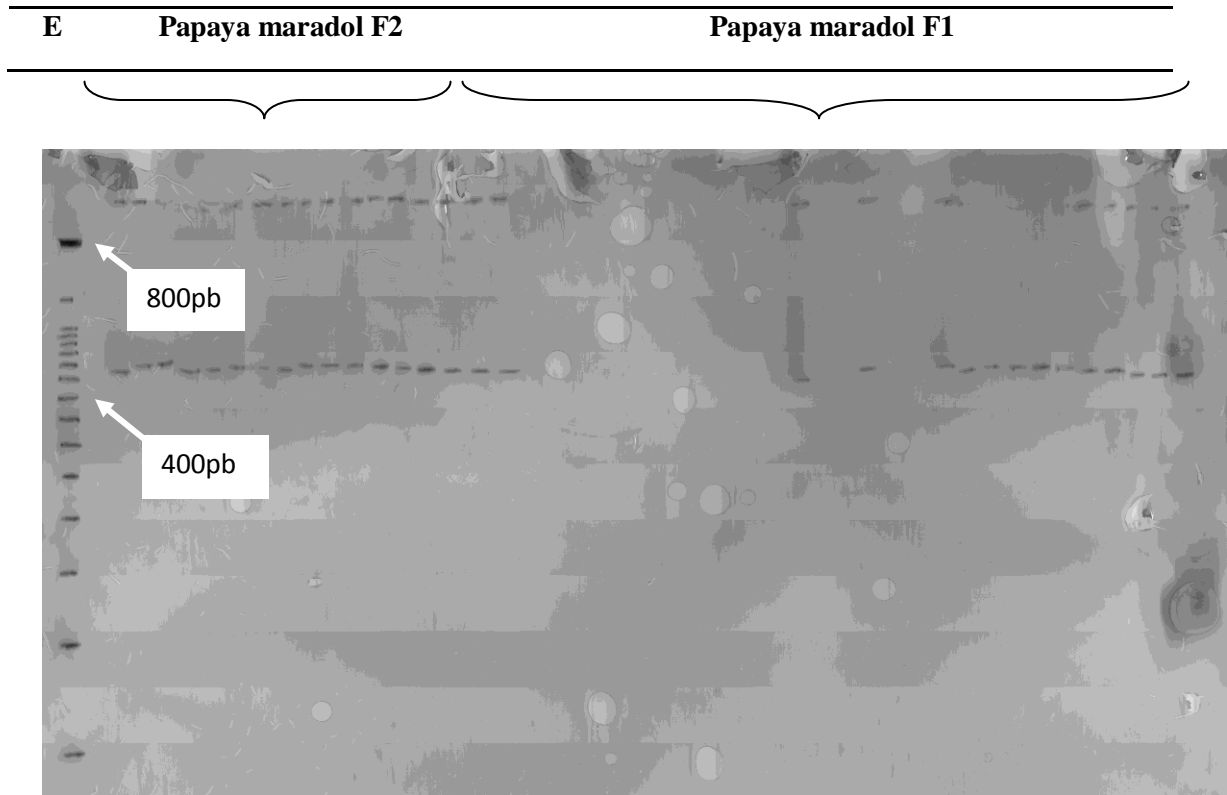


Figura 12: Gel de secuenciación microsatélite PM6 de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2. E: Escalera de 50pb.

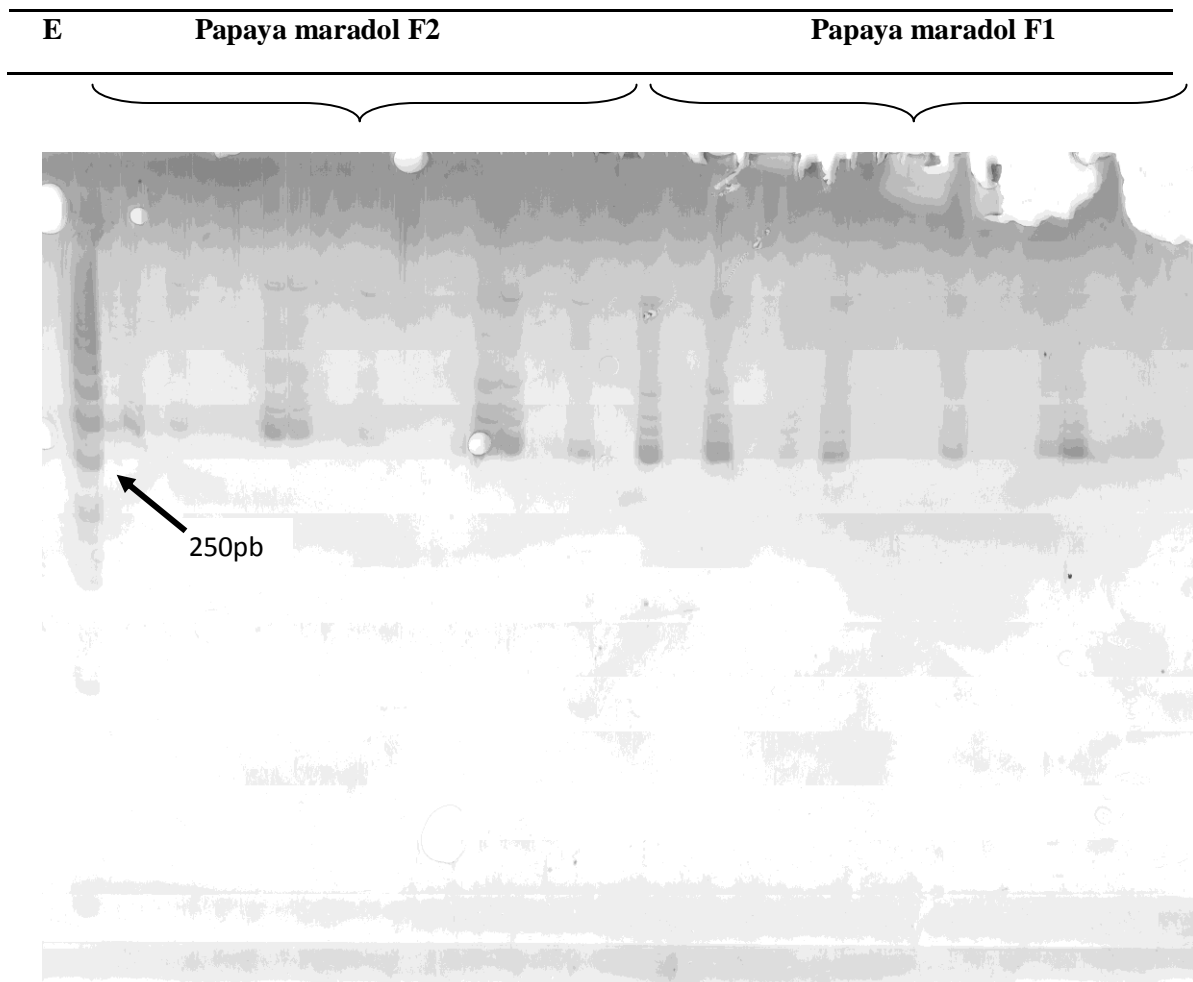


Figura 12: Gel de secuenciación microsatélite PM1 de las muestras de Retalhuleu, Papaya Maradol F1 y F2. E: Escalera de 50pb.

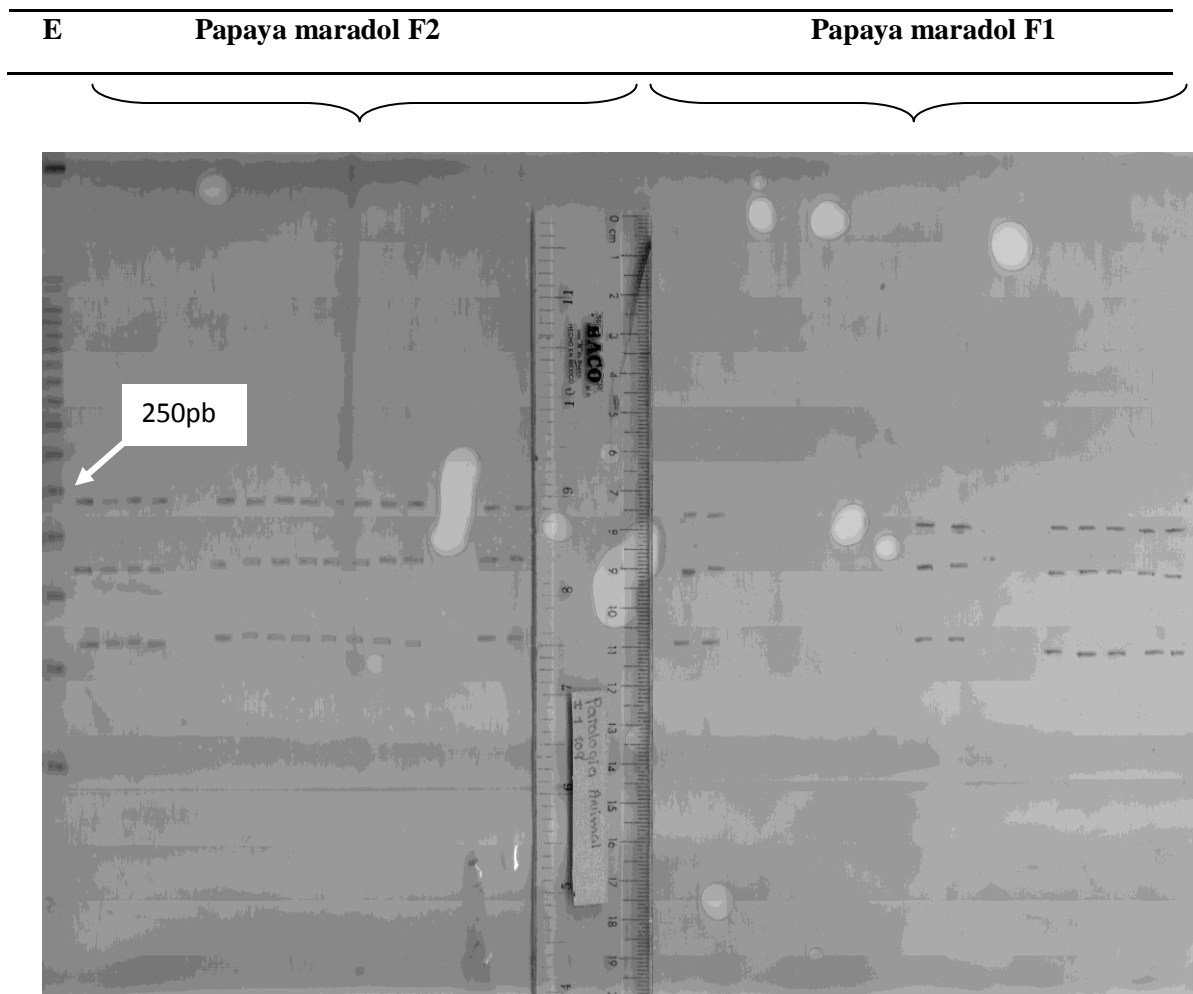


Figura 13: Gel de secuenciación microsatélite PM3 de las muestras de Retalhuleu, Papaya Maradol F1 y F2. E: Escalera de 50pb.

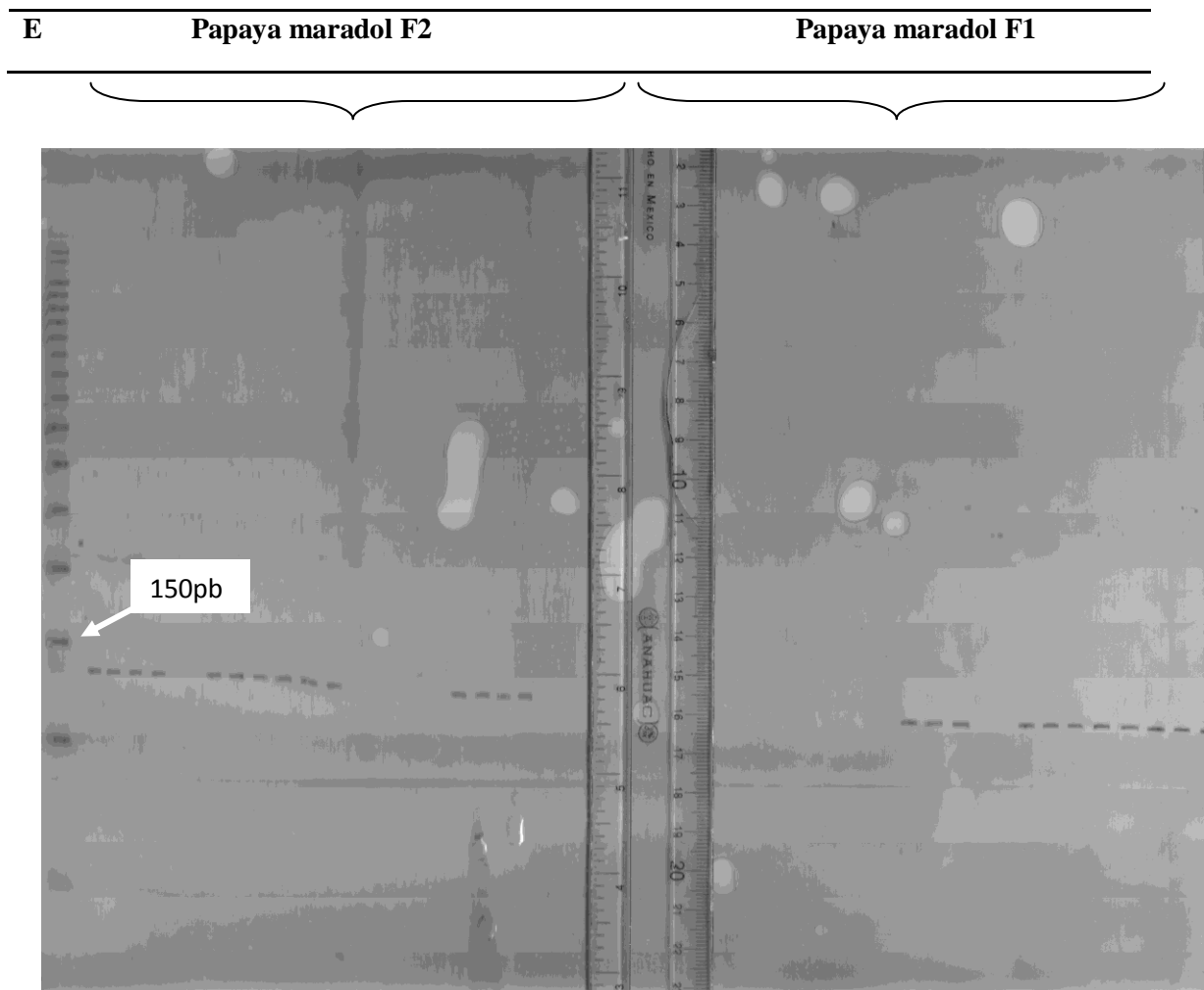


Figura 14: Gel de secuenciación intermicrosatélite IMP2 de las muestras de Escuintla, Papaya Maradol F1 y F2.

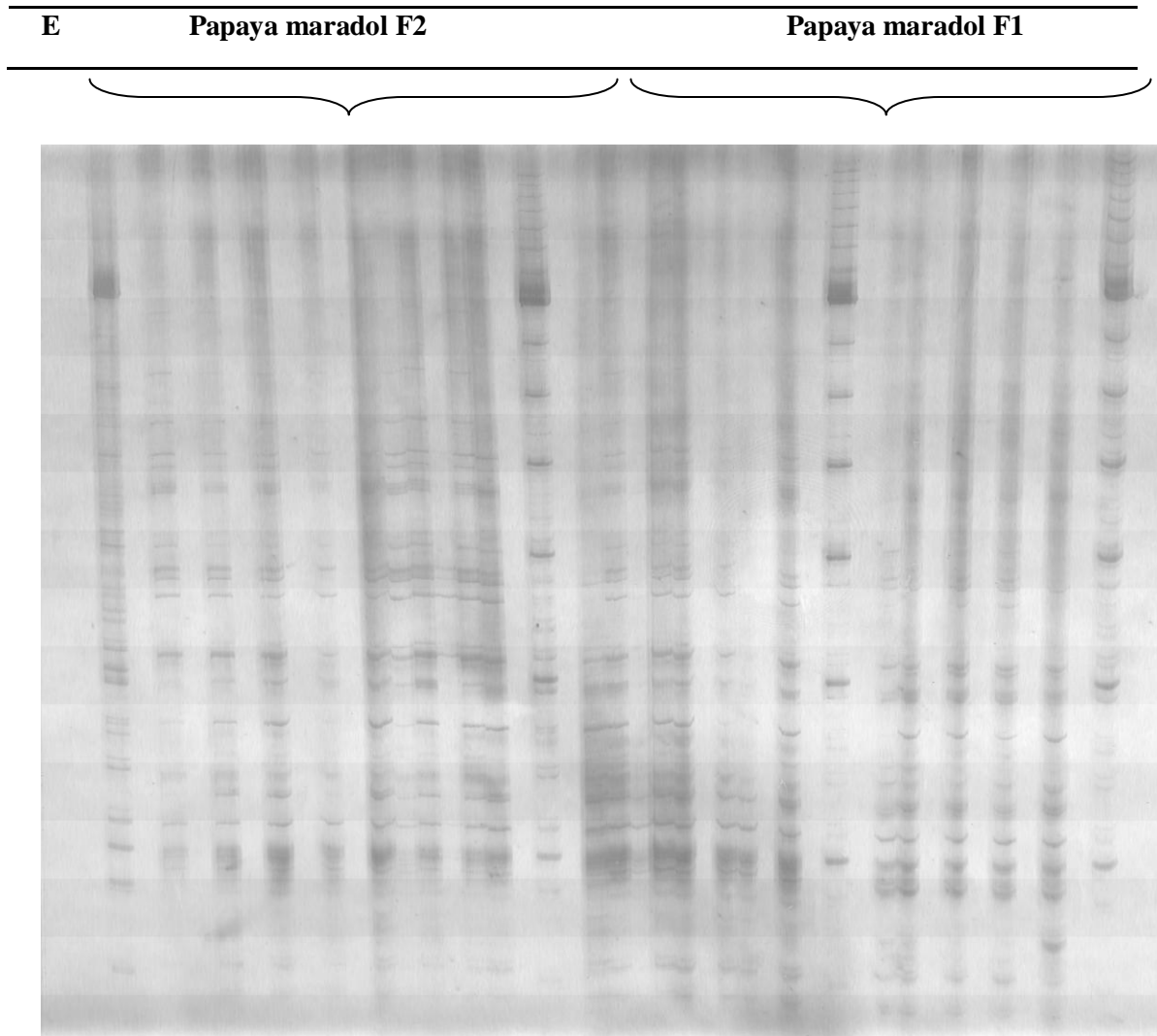
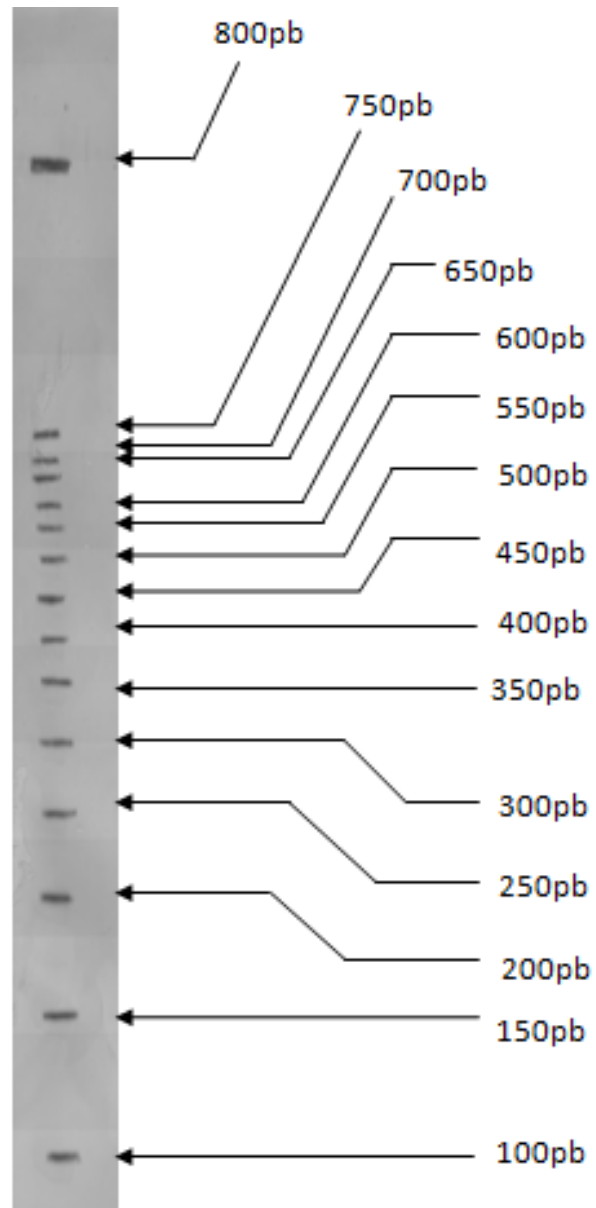


Figura 15: Esquema de la escalera Promega de 50pb.





Cuadro 23: Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP2, en el departamento de Escuintla.

No. Muestra	F2															F1															Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Continuación Cuadro 23.

No. Muestra	F2															F1															To mat e		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		2	3
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Cuadro 24: Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP1, en el departamento de Retalhuleu

No. Muestra	F2															F1															Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	
0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0		
1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	

Cuadro 25: Presencia / ausencia de alelos por muestra de las generaciones F1 y F2 de papaya Maradol tras la amplificación de la secuencia ISSR, IMP2, en el departamento de Retalhuleu.

No. Muestra	F2															F1															To mat e		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		3	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Cuadro 26: Lista de las heterocigosidades observadas y esperadas de cada una de las regiones evaluadas.

Región geográfica / tipo de iniciador	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	Chi-cuadrado
Escuintla / IPM1	0.2083	0.115	
Escuintla / IPM2	0.2843	0.145	0.6471
Retalhuleu / IPM1	0.3160	0.199	
Retalhuleu / IPM2	0.3340	0.201	0.6921

CUADRO 27: Lista de heterocigosidades esperadas y observadas de cada una de las generaciones filiales por separado en cada una de las poblaciones.

Región geográfica / tipo de iniciador	F1			F2		
	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	chi- cuadrado	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	chi- cuadrado
Escuintla / IPM1	0.3080	0.0970	0.3201	0.1010	0.1230	0.8810
Escuintla / IPM2	0.3280	0.0990				
Retalhuleu / IPM1	0.3460	0.1100	0.4223	0.0230	0.0980	0.7593
Retalhuleu / IPM2	0.3156	0.1650				

CUADRO 28: Valores de Chi cuadrado y valores P para observar equilibrio de Hardy Weinberg dentro de las poblaciones de Escuintla y Retalhuleu. Con un valor  $P < 0.05$ . Y un nivel de significancia de Chi cuadrado para 1 grado de libertad de 3.84.

Región geográfica / tipo de iniciador	valor Chi cuadrado	valor P	Equilibrio de Hardy Weinberg
Escuintla / IPM1	4.611852	0.3156	desequilibrio
Escuintla / IPM2	5.791557	0.4296	desequilibrio
Retalhuleu / IPM1	3.901842	0.4013	desequilibrio
Retalhuleu / IPM2	3.8774	0.4280	desequilibrio

CUADRO 29: Índices de similitud de las muestras de Escuintla amplificadas con el iniciador IPM1.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	1	0.53	0.45	0.39	0.36	0.29	0.47	0.5	0.52	0.52	0.43	0.33	0.37	0.31	0.29	0.37	0.28	0.41	0.32	0.2	0.45	0.4	0.47	0.42	0.33	0.3	0.29	0.44	0.26	0.4
2	0.53	1	0.68	0.49	0.52	0.41	0.64	0.73	0.75	0.57	0.46	0.42	0.55	0.4	0.47	0.41	0.32	0.37	0.34	0.23	0.46	0.31	0.37	0.38	0.27	0.33	0.22	0.31	0.35	0.29
3	0.45	0.68	1	0.55	0.47	0.58	0.59	0.75	0.74	0.67	0.49	0.55	0.61	0.54	0.59	0.53	0.51	0.32	0.27	0.22	0.53	0.43	0.41	0.46	0.32	0.37	0.26	0.35	0.34	0.21
4	0.39	0.49	0.55	1	0.36	0.41	0.47	0.57	0.52	0.52	0.36	0.33	0.53	0.58	0.54	0.41	0.37	0.3	0.25	0.1	0.42	0.44	0.33	0.35	0.19	0.38	0.14	0.32	0.26	0.2
5	0.36	0.52	0.47	0.36	1	0.29	0.42	0.53	0.44	0.35	0.3	0.39	0.38	0.37	0.29	0.38	0.33	0.21	0.29	0.24	0.39	0.28	0.28	0.36	0.23	0.39	0.17	0.19	0.19	0.15
6	0.29	0.41	0.58	0.41	0.29	1	0.29	0.51	0.5	0.49	0.21	0.46	0.38	0.44	0.51	0.33	0.4	0.2	0.16	0.15	0.3	0.38	0.33	0.41	0.28	0.2	0.21	0.32	0.23	0.09
7	0.47	0.64	0.59	0.47	0.42	0.29	1	0.6	0.63	0.43	0.37	0.39	0.57	0.37	0.34	0.33	0.33	0.3	0.32	0.24	0.48	0.33	0.39	0.31	0.29	0.26	0.23	0.28	0.25	0.34
8	0.5	0.73	0.75	0.57	0.53	0.51	0.6	1	0.78	0.61	0.51	0.57	0.59	0.56	0.61	0.47	0.44	0.31	0.36	0.16	0.47	0.42	0.39	0.44	0.35	0.39	0.3	0.33	0.32	0.31
9	0.52	0.75	0.74	0.52	0.44	0.5	0.63	0.78	1	0.6	0.47	0.47	0.54	0.5	0.55	0.42	0.33	0.26	0.29	0.15	0.46	0.29	0.43	0.43	0.34	0.35	0.29	0.29	0.32	0.31
10	0.52	0.57	0.67	0.52	0.35	0.49	0.43	0.61	0.6	1	0.42	0.5	0.46	0.49	0.59	0.49	0.36	0.4	0.24	0.17	0.49	0.48	0.36	0.42	0.26	0.33	0.21	0.39	0.29	0.32
11	0.43	0.46	0.49	0.36	0.3	0.21	0.37	0.51	0.47	0.42	1	0.34	0.34	0.32	0.38	0.33	0.24	0.38	0.52	0.26	0.35	0.33	0.29	0.27	0.2	0.31	0.24	0.24	0.21	0.41
12	0.33	0.42	0.55	0.33	0.39	0.46	0.39	0.57	0.47	0.5	0.34	1	0.43	0.39	0.35	0.34	0.41	0.3	0.2	0.23	0.36	0.33	0.34	0.32	0.5	0.26	0.43	0.33	0.16	0.22
13	0.37	0.55	0.61	0.53	0.38	0.38	0.57	0.59	0.54	0.46	0.34	0.43	1	0.51	0.43	0.43	0.34	0.38	0.26	0.21	0.43	0.42	0.39	0.36	0.3	0.35	0.25	0.33	0.27	0.28
14	0.31	0.4	0.54	0.58	0.37	0.44	0.37	0.56	0.5	0.49	0.32	0.39	0.51	1	0.71	0.56	0.46	0.16	0.22	0	0.28	0.3	0.38	0.23	0.24	0.28	0.16	0.12	0.18	0.19
15	0.29	0.47	0.59	0.54	0.29	0.51	0.34	0.61	0.55	0.59	0.38	0.35	0.43	0.71	1	0.57	0.41	0.2	0.24	0.15	0.31	0.33	0.41	0.32	0.21	0.26	0.14	0.22	0.4	0.22
16	0.37	0.41	0.53	0.41	0.38	0.33	0.33	0.47	0.42	0.49	0.33	0.34	0.43	0.56	0.57	1	0.53	0.24	0.2	0.3	0.3	0.32	0.33	0.31	0.14	0.3	0.14	0.16	0.23	0.13
17	0.28	0.32	0.51	0.37	0.33	0.4	0.33	0.44	0.33	0.36	0.24	0.41	0.34	0.46	0.41	0.53	1	0.17	0.27	0.29	0.29	0.32	0.33	0.24	0.26	0.24	0.26	0.26	0.3	0.05
18	0.41	0.37	0.32	0.3	0.21	0.2	0.3	0.31	0.26	0.4	0.38	0.3	0.38	0.16	0.2	0.24	0.17	1	0.22	0.25	0.53	0.57	0.34	0.45	0.29	0.49	0.29	0.48	0.19	0.31
19	0.32	0.34	0.27	0.25	0.29	0.16	0.32	0.36	0.29	0.24	0.52	0.2	0.26	0.22	0.24	0.2	0.27	0.22	1	0.34	0.26	0.16	0.32	0.15	0.28	0.26	0.33	0.2	0.25	0.46
20	0.2	0.23	0.22	0.1	0.24	0.15	0.24	0.16	0.15	0.17	0.26	0.23	0.21	0	0.15	0.3	0.29	0.25	0.34	1	0.32	0.21	0.48	0.33	0.4	0.32	0.4	0.29	0.35	0.21
21	0.45	0.46	0.53	0.42	0.39	0.3	0.48	0.47	0.46	0.49	0.35	0.36	0.43	0.28	0.31	0.3	0.29	0.53	0.26	0.32	1	0.68	0.59	0.65	0.48	0.77	0.42	0.68	0.27	0.31
22	0.4	0.31	0.43	0.44	0.28	0.38	0.33	0.42	0.29	0.48	0.33	0.33	0.42	0.3	0.33	0.32	0.32	0.57	0.16	0.21	0.68	1	0.39	0.65	0.27	0.63	0.2	0.68	0.22	0.25
23	0.47	0.37	0.41	0.33	0.28	0.33	0.39	0.39	0.43	0.36	0.29	0.34	0.39	0.38	0.41	0.33	0.33	0.34	0.32	0.48	0.59	0.39	1	0.48	0.7	0.41	0.61	0.45	0.5	0.29
24	0.42	0.38	0.46	0.35	0.36	0.41	0.31	0.44	0.43	0.42	0.27	0.32	0.36	0.23	0.32	0.31	0.24	0.45	0.15	0.33	0.65	0.65	0.48	1	0.44	0.65	0.37	0.7	0.28	0.2
25	0.33	0.27	0.32	0.19	0.23	0.28	0.29	0.35	0.34	0.26	0.2	0.5	0.3	0.24	0.21	0.14	0.26	0.29	0.28	0.4	0.48	0.27	0.7	0.44	1	0.42	0.91	0.53	0.32	0.25
26	0.3	0.33	0.37	0.38	0.39	0.2	0.26	0.39	0.35	0.33	0.31	0.26	0.35	0.28	0.26	0.3	0.24	0.49	0.26	0.32	0.77	0.63	0.41	0.65	0.42	1	0.42	0.59	0.27	0.24
27	0.29	0.22	0.26	0.14	0.17	0.21	0.23	0.3	0.29	0.21	0.24	0.43	0.25	0.16	0.14	0.14	0.26	0.29	0.33	0.4	0.42	0.2	0.61	0.37	0.91	0.42	1	0.47	0.32	0.25
28	0.44	0.31	0.35	0.32	0.19	0.32	0.28	0.33	0.29	0.39	0.24	0.33	0.33	0.12	0.22	0.16	0.26	0.48	0.2	0.29	0.68	0.68	0.45	0.7	0.53	0.59	0.47	1	0.37	0.29

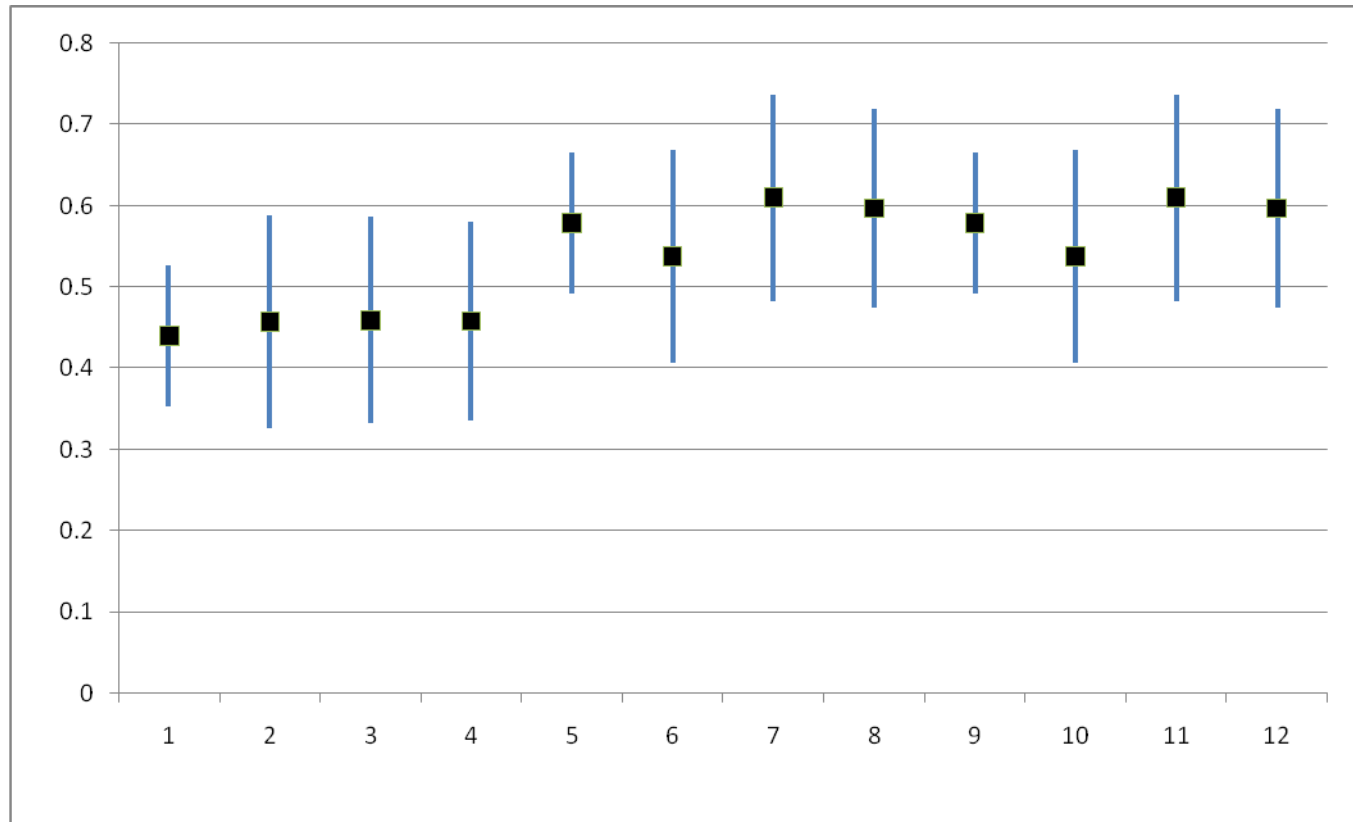
CUADRO 30: Índices de similitud de las muestras de Escuintla amplificadas con el iniciador IPM2.

muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
1	1	0.2	0.24	0.14	0.17	0.14	0.08	0.12	0.09	0.16	0.15	0.15	0.17	0.05	0.07	0.15	0.06	0.41	0.32	0.2	0.45	0.4	0.47	0.42	0.33	0.3	0.29	0.44	0.26	0.4
2	0.2	1	0.32	0.26	0.24	0.09	0.2	0.17	0.07	0.14	0.23	0.05	0.12	0.1	0.02	0.07	0.05	0.37	0.34	0.23	0.46	0.31	0.37	0.38	0.27	0.33	0.22	0.31	0.35	0.29
3	0.24	0.32	1	0.34	0.14	0.14	0.08	0.11	0.09	0.08	0.14	0.13	0.12	0	0.07	0.15	0.13	0.32	0.27	0.22	0.53	0.43	0.41	0.46	0.32	0.37	0.26	0.35	0.34	0.21
4	0.14	0.26	0.34	1	0.12	0.14	0.18	0.15	0.08	0.13	0.27	0.18	0.12	0.09	0.13	0.2	0.23	0.3	0.25	0.1	0.42	0.44	0.33	0.35	0.19	0.38	0.14	0.32	0.26	0.2
5	0.17	0.24	0.14	0.12	1	0.17	0.22	0.16	0.1	0.13	0.16	0.19	0.13	0.14	0.11	0.1	0.14	0.21	0.29	0.24	0.39	0.28	0.28	0.36	0.23	0.39	0.17	0.19	0.19	0.15
6	0.14	0.09	0.14	0.14	0.17	1	0.24	0.17	0.26	0.18	0.2	0.18	0.2	0.2	0.1	0.22	0.12	0.2	0.16	0.15	0.3	0.38	0.33	0.41	0.28	0.2	0.21	0.32	0.23	0.09
7	0.08	0.2	0.08	0.18	0.22	0.24	1	0.19	0.18	0.14	0.25	0.16	0.15	0.05	0.12	0.11	0.16	0.3	0.32	0.24	0.48	0.33	0.39	0.31	0.29	0.26	0.23	0.28	0.25	0.34
8	0.12	0.17	0.11	0.15	0.16	0.17	0.19	1	0.21	0.19	0.31	0.23	0.11	0.19	0.2	0.25	0.16	0.31	0.36	0.16	0.47	0.42	0.39	0.44	0.35	0.39	0.3	0.33	0.32	0.31
9	0.09	0.07	0.09	0.08	0.1	0.26	0.18	0.21	1	0.13	0.31	0.18	0.14	0.2	0.29	0.17	0.22	0.26	0.29	0.15	0.46	0.29	0.43	0.43	0.34	0.35	0.29	0.29	0.32	0.31
10	0.16	0.14	0.08	0.13	0.13	0.18	0.14	0.19	0.13	1	0.29	0.26	0.36	0.18	0.24	0.16	0.2	0.4	0.24	0.17	0.49	0.48	0.36	0.42	0.26	0.33	0.21	0.39	0.29	0.32
11	0.15	0.23	0.14	0.27	0.16	0.2	0.25	0.31	0.31	0.29	1	0.33	0.25	0.12	0.17	0.22	0.24	0.38	0.52	0.26	0.35	0.33	0.29	0.27	0.2	0.31	0.24	0.24	0.21	0.41
12	0.15	0.05	0.13	0.18	0.19	0.18	0.16	0.23	0.18	0.26	0.33	1	0.2	0.16	0.19	0.24	0.21	0.3	0.2	0.23	0.36	0.33	0.34	0.32	0.5	0.26	0.43	0.33	0.16	0.22
13	0.17	0.12	0.12	0.12	0.13	0.2	0.15	0.11	0.14	0.36	0.25	0.2	1	0.31	0.26	0.16	0.26	0.38	0.26	0.21	0.43	0.42	0.39	0.36	0.3	0.35	0.25	0.33	0.27	0.28
14	0.05	0.1	0	0.09	0.14	0.2	0.05	0.19	0.2	0.18	0.12	0.16	0.31	1	0.24	0.19	0.22	0.16	0.22	0	0.28	0.3	0.38	0.23	0.24	0.28	0.16	0.12	0.18	0.19
15	0.07	0.02	0.07	0.13	0.11	0.1	0.12	0.2	0.29	0.24	0.17	0.19	0.26	0.24	1	0.25	0.27	0.2	0.24	0.15	0.31	0.33	0.41	0.32	0.21	0.26	0.14	0.22	0.4	0.22
16	0.15	0.07	0.15	0.2	0.1	0.22	0.11	0.25	0.17	0.16	0.22	0.24	0.16	0.19	0.25	1	0.25	0.24	0.2	0.3	0.3	0.32	0.33	0.31	0.14	0.3	0.14	0.16	0.23	0.13
17	0.06	0.05	0.13	0.23	0.14	0.12	0.16	0.16	0.22	0.2	0.24	0.21	0.26	0.22	0.27	0.25	1	0.17	0.27	0.29	0.29	0.32	0.33	0.24	0.26	0.24	0.26	0.26	0.3	0.05
18	0.42	0.44	0.33	0.35	0.19	0.38	0.14	0.15	0.23	0.14	0.27	0.16	0.2	0.16	0.12	0.18	0.19	1	0.22	0.25	0.53	0.57	0.34	0.45	0.29	0.49	0.29	0.48	0.19	0.31
19	0.39	0.28	0.28	0.36	0.23	0.39	0.17	0.15	0.05	0.13	0.18	0.19	0.18	0.14	0.22	0.4	0.22	0.22	1	0.34	0.26	0.16	0.32	0.15	0.28	0.26	0.33	0.2	0.25	0.46
20	0.3	0.38	0.33	0.41	0.28	0.2	0.21	0.17	0.12	0.12	0.12	0.13	0.2	0.14	0.16	0.23	0.13	0.25	0.34	1	0.32	0.21	0.48	0.33	0.4	0.32	0.4	0.29	0.35	0.21
21	0.48	0.33	0.39	0.31	0.29	0.26	0.23	0.05	0.1	0	0.09	0.14	0.2	0.26	0.26	0.3	0.05	0.53	0.26	0.32	1	0.68	0.59	0.65	0.48	0.77	0.42	0.68	0.27	0.31
22	0.47	0.42	0.39	0.44	0.35	0.39	0.3	0.48	0.33	0.39	0.31	0.29	0.26	0.29	0.48	0.19	0.31	0.57	0.16	0.21	0.68	1	0.39	0.65	0.27	0.63	0.2	0.68	0.22	0.25
23	0.46	0.29	0.43	0.43	0.34	0.35	0.29	0.47	0.42	0.39	0.44	0.35	0.39	0.33	0.2	0.25	0.46	0.34	0.32	0.48	0.59	0.39	1	0.48	0.7	0.41	0.61	0.45	0.5	0.29
24	0.16	0.15	0.23	0.14	0.27	0.16	0.2	0.46	0.29	0.43	0.43	0.34	0.35	0.4	0.29	0.35	0.21	0.45	0.15	0.33	0.65	0.65	0.48	1	0.44	0.65	0.37	0.7	0.28	0.2
25	0.19	0.15	0.05	0.13	0.18	0.19	0.18	0.49	0.48	0.36	0.42	0.26	0.33	0.42	0.68	0.27	0.31	0.29	0.28	0.4	0.48	0.27	0.7	0.44	1	0.42	0.91	0.53	0.32	0.25
26	0.13	0.17	0.12	0.12	0.12	0.13	0.2	0.35	0.33	0.29	0.27	0.2	0.31	0.2	0.68	0.22	0.25	0.49	0.26	0.32	0.77	0.63	0.41	0.65	0.42	1	0.42	0.59	0.27	0.24
27	0.14	0.05	0.1	0	0.09	0.14	0.2	0.36	0.33	0.34	0.32	0.5	0.26	0.61	0.45	0.5	0.29	0.29	0.33	0.4	0.42	0.2	0.61	0.37	0.91	0.42	1	0.47	0.32	0.25
28	0.21	0.43	0.42	0.39	0.36	0.3	0.32	0.43	0.42	0.39	0.36	0.3	0.35	0.37	0.7	0.28	0.2	0.48	0.2	0.29	0.68	0.68	0.45	0.7	0.53	0.59	0.47	1	0.37	0.29
29	0.14	0.2	0.05	0.19	0.2	0.18	0.12	0.16	0.31	0.31	0.2	0.68	0.22	0.91	0.53	0.32	0.25	0.19	0.25	0.35	0.27	0.22	0.5	0.28	0.32	0.27	0.32	0.37	1	0.16
30	0.11	0.1	0.12	0.2	0.29	0.24	0.17	0.19	0.26	0.26	0.61	0.45	0.5	0.42	0.59	0.27	0.24	0.31	0.46	0.21	0.31	0.25	0.29	0.2	0.25	0.24	0.25	0.29	0.16	1

CUADRO 31: Índices de similitud promedio de las muestras F1 y F2 de cada uno de los departamentos e iniciadores muestreados. Con su respectiva desviación estándar y su intervalo de confianza con un 95% de confianza.

	F1	Desviación estándar F1 ( $\pm$ )	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior	F2	Desviación estándar F1 ( $\pm$ )	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior	General de la población	Desviación estándar F1 ( $\pm$ )	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
IPM1/ Escuintla	0.4401	0.08725	0.4287	0.4515	0.5786	0.1010	0.5654	0.5654	0.3277	0.1243	0.3115	0.3115
IPM2/ Escuintla	0.4576	0.1310	0.4405	0.4747	0.5378	0.1176	0.5224	0.5224	0.3714	0.1001	0.3583	0.3583
IPM1/ Retalhuleu	0.4597	0.1271	0.4431	0.4763	0.6101	0.1361	0.5923	0.5923	0.3897	0.1287	0.3729	0.3729
IPM2/ Retalhuleu	0.4583	0.1225	0.4423	0.4743	0.5963	0.1153	0.5812	0.5812	0.3997	0.1238	0.3835	0.3835

Figura 16: Grado de confianza de los índices de similitud. En el eje X se muestra el número de mediciones, y en el eje Y el valor promedio con su desviación estándar de los índices de similitud. Muestra 1- 4: índice similitud grupo F1, muestra 5-8: índice similitud grupo F2, muestra 9-12: índice similitud general de la población.



CUADRO 32: Valores de los índices de fijación total de la población (Fst) de las muestras F1 y F2 de papaya maradol.

	<b>Valores de Fst</b>
<b>Población F1 y F2 del departamento de Escuintla</b>	0.137
<b>Población F1 y F2 del departamento de Retalhuleu</b>	0.139





Figura 19: Dendrograma basado en Neighbor joining de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM1.

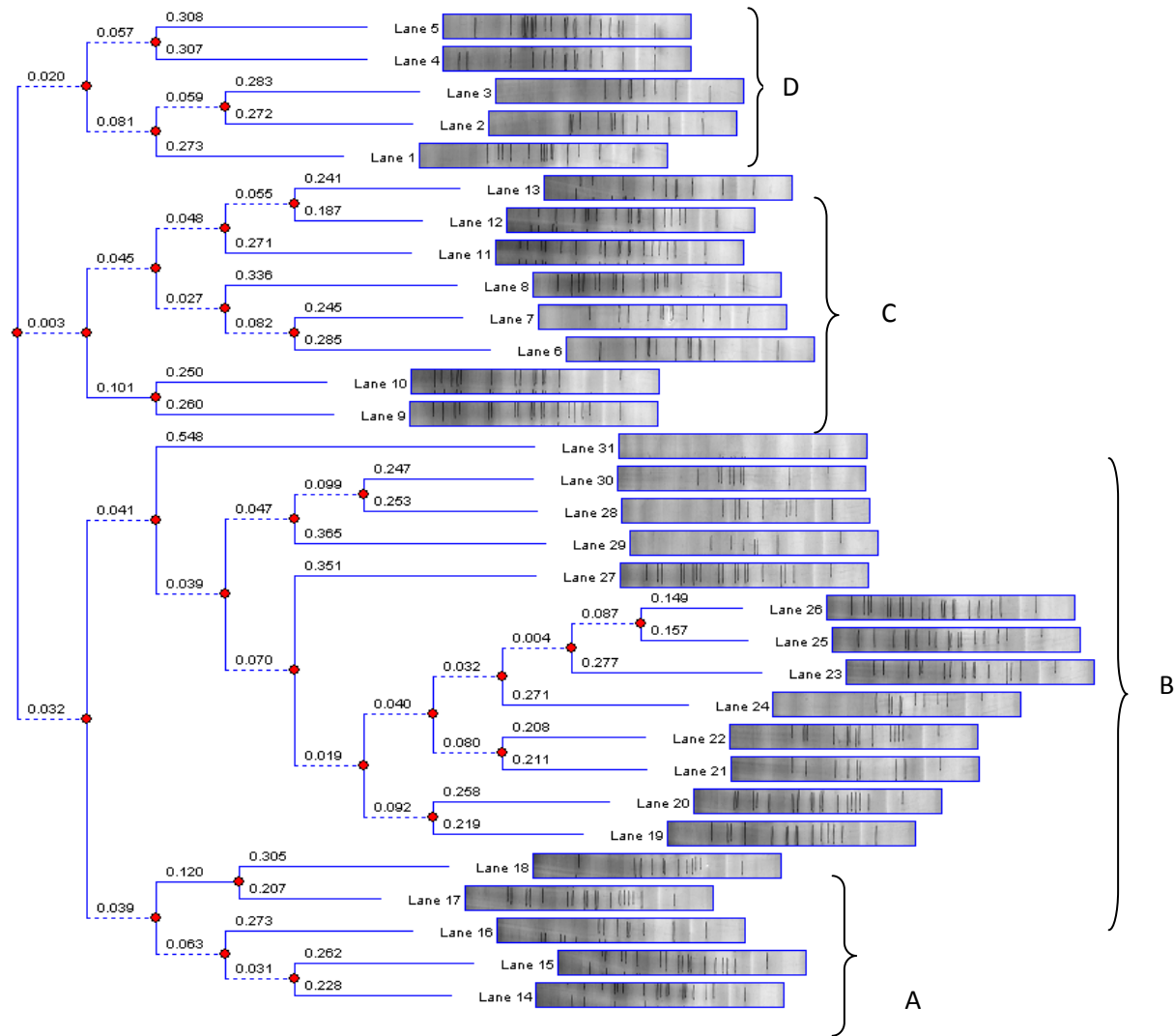




Figura 21: Dendrograma basado en el análisis por agrupamiento UPGMA de las muestras de Escuintla, utilizando el iniciador IPM1.

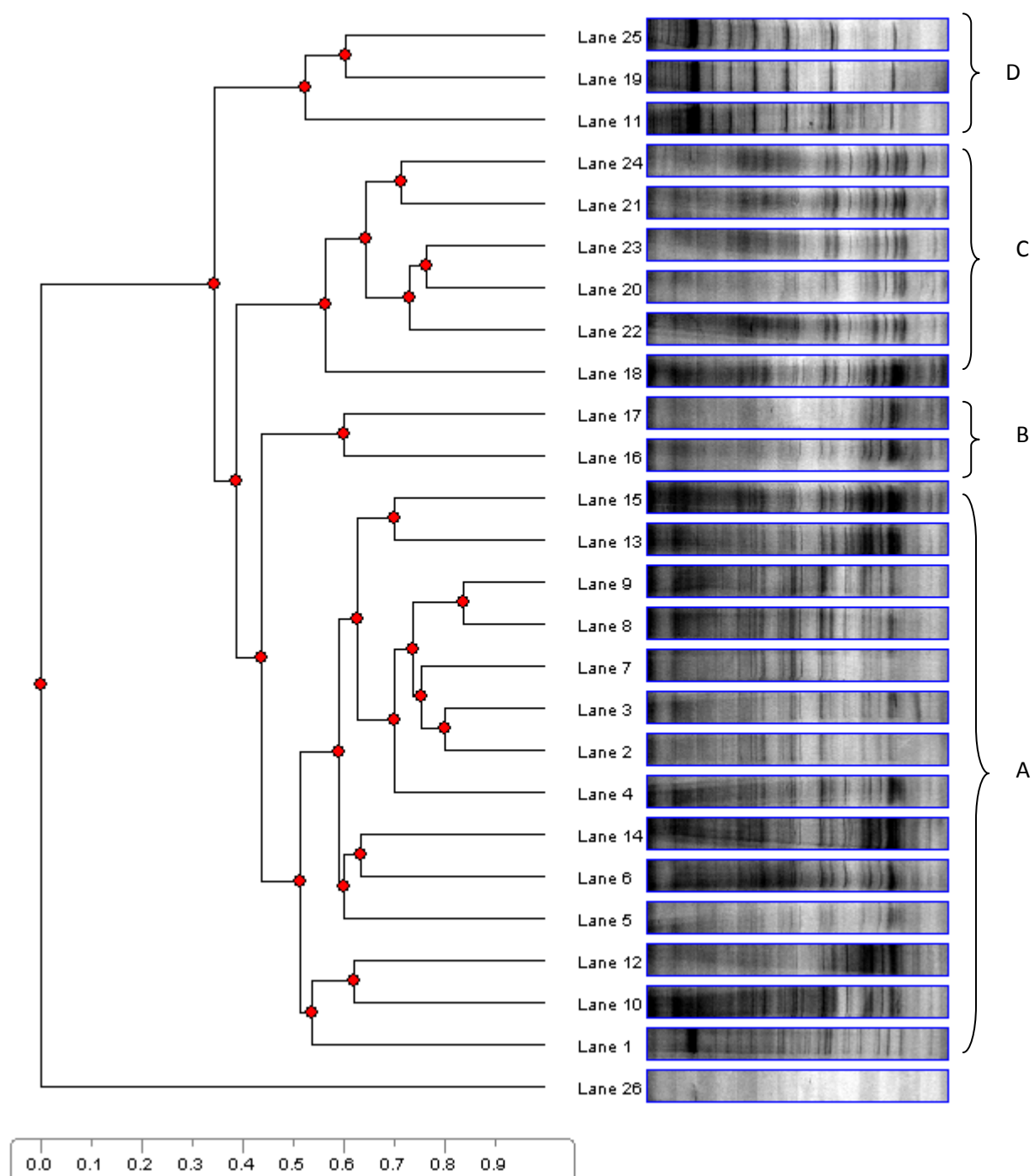


Figura 22: Dendrograma basado en el análisis por agrupamiento UPGMA de las muestras de Escuintla, utilizando el iniciador IPM2.

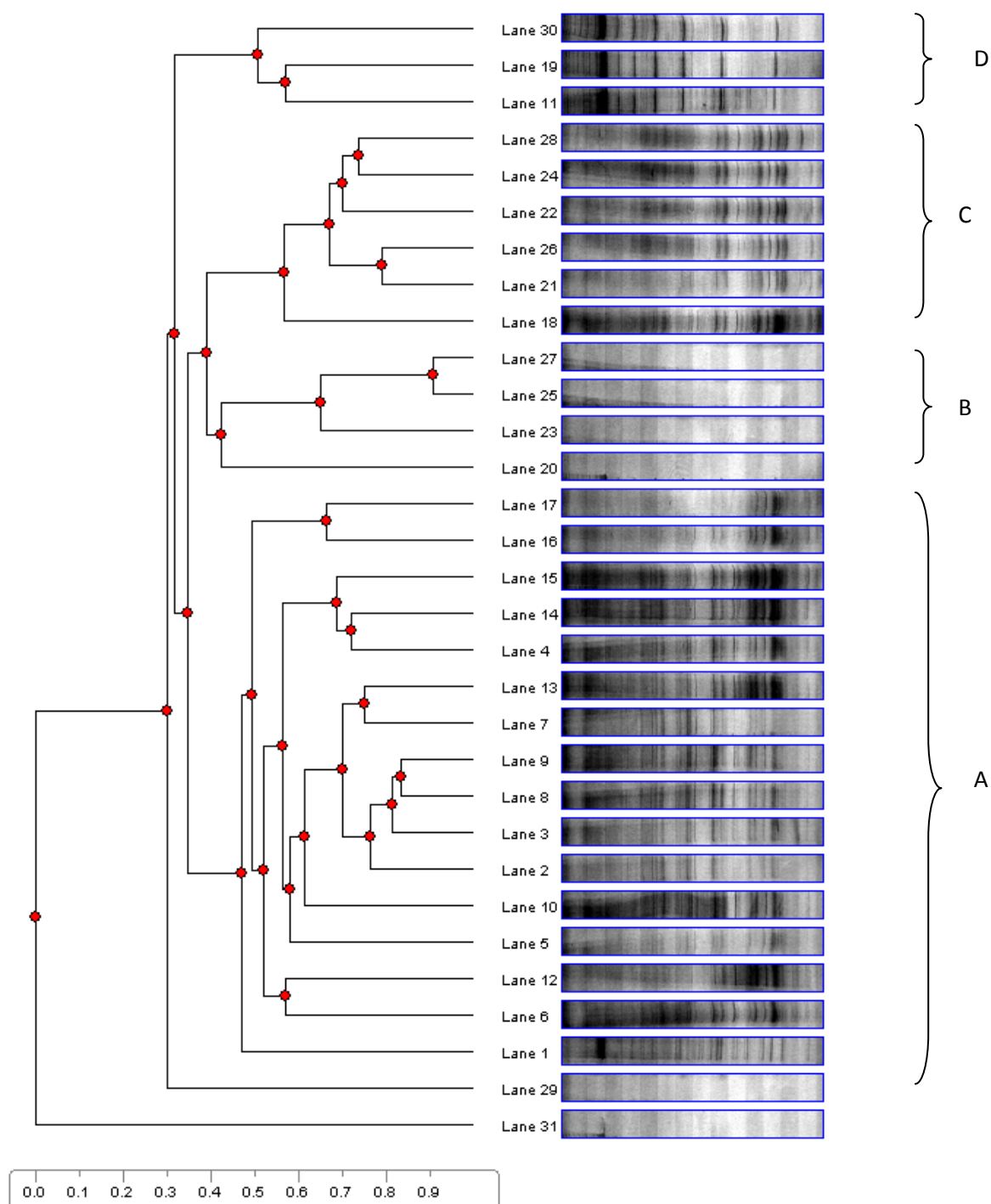


Figura 23: Dendrograma basado en el análisis por agrupamiento UPGMA de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM1.

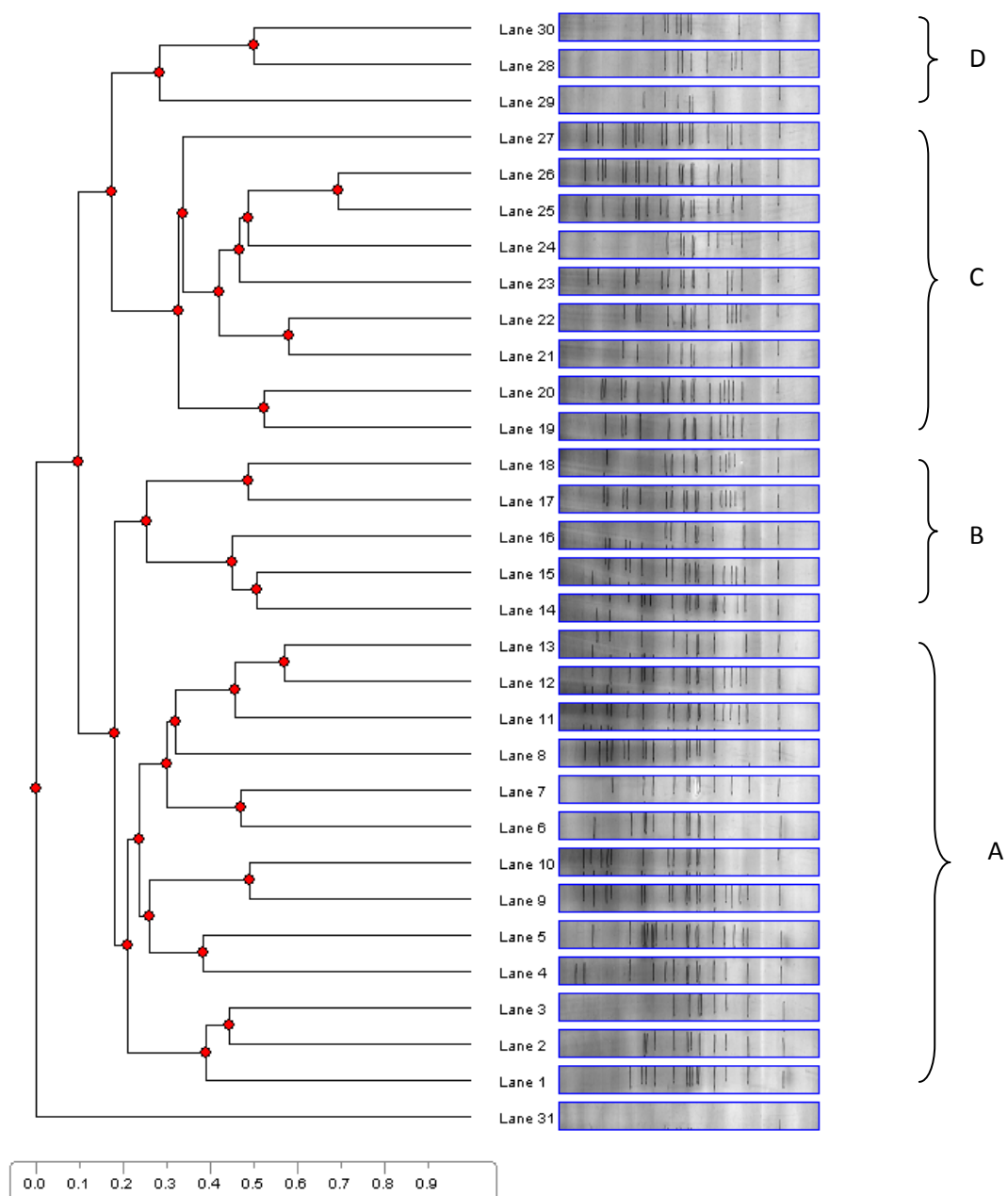


Figura 24: Dendrograma con UPGMA de las muestras de Retalhuleu, utilizando el iniciador IPM2.

