

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**

**EVALUACIÓN DEL USO DEL MARCADOR MOLECULAR TIPO SCAR EN LA
IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) HÍBRIDO
TAINUNG-1, GUATEMALA, C.A.**

JUAN PABLO FIGUEROA AMÉZQUITA

GUATEMALA, OCTUBRE 2022

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**“EVALUACIÓN DEL USO DEL MARCADOR MOLECULAR TIPO SCAR EN LA
IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) HÍBRIDO
TAINUNG-1, GUATEMALA, C.A.”**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

JUAN PABLO FIGUEROA AMÉZQUITA

**En el acto de investidura como
INGENIERO AGRÓNOMO EN
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO**

GUATEMALA, OCTUBRE 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTA DE AGRONOMÍA

RECTOR

M.A. WALTER MAZARIEGOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Decano:	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
Vocal I:	Dr. Marvin Roberto Salguero Barahona
Vocal II:	Dr. Gricelda Lily Gutiérrez Álvarez
Vocal III:	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
Vocal IV:	Br. Carmen Aracely García Pirque
Vocal V:	P. Agr. Mynor Fernando Almengor Orenos
Secretario Académico:	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López

GUATEMALA, OCTUBRE 2022

Guatemala, octubre de 2022

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Distinguidos Miembros:

De acuerdo con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el documento de tesis titulado:

“EVALUACIÓN DEL USO DEL MARCADOR MOLECULAR TIPO SCAR EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) HÍBRIDO TAINUNG-1, GUATEMALA, C.A.”

Presentando como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el presente documento llene los requisitos necesarios para su aprobación agradeciendo la atención prestada a la presente.

Atentamente

“Id y enseñad a todos”



JUAN PABLO FIGUEROA AMÉZQUITA

ACTO QUE DEDICO

A

- DIOS:** Por ser mi fortaleza y mi compañía, por bendecirme y ayudarme a llegar hasta este punto.
- MIS PADRES:** María Luz Amézquita y Carlos Enrique Figueroa, por su apoyo, amor, cariño y porque cada día se esfuerzan para seguir adelante y ser el centro de mi motivación.
- MI HERMANO:** Juan Carlos Figueroa, por estar cuando te necesito, por tu apoyo y motivación.
- MIS TIOS (AS):** Por su cariño, su motivación y por estar cuando los necesito apoyándome.
- MIS PRIMOS (AS):** Por su apoyo, sus ánimos, cariño y amistad.
- FAM. RAMÍREZ-ASENCIO:** Por ser tan especial conmigo, por todo su amor y apoyo durante los últimos años.
- MIS AMIGOS** Todas esas personas que me han brindado su apoyo desde el inicio de la carrera.

TESIS QUE DEDICO

A

DIOS: Por darme la sabiduría en todo momento desde el inicio hasta el fin de mi carrera.

GUATEMALA: País que me ha brindado las oportunidades de estudiar y de ejercer mi profesión y por ser un país con riqueza agrícola.

ASUNCIÓN MITA: Pueblo que me vio nacer, crecer y que siempre estará en mi corazón.

USAC: Mi alma mater, orgulloso de ser parte de esta casa de estudios.

AGRADECIMIENTO

A

- Dios:** Por ser mi fortaleza y motivación de cada día.
- Mi Familia:** Por ser mi pilar, por nunca dejarme solo y motivarme a seguir cada día.
- Fam. Ramírez-Asencio** Por brindarme su apoyo en todo momento.
- Ing. Amílcar Sánchez** Por su asesoría, su consejo y guía. Gracias, por su apoyo en mi formación como estudiante.
- Ing. Julio Berdúo** Por su asesoría, su dedicación y paciencia al momento de realizar la tesis.
- MIS AMIGOS** Todos mis amigos en general, en especial al grupo de compañeros con quien realizamos la tesis juntos en el laboratorio de biotecnología, FAUSAC.

ÍNDICE DE CONTENIDO

		PÁGINA
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	Marco conceptual	3
2.1.1.	Cultivo de papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	3
2.1.2.	Taxonomía	4
2.1.3.	Componentes de la planta.....	5
A.	Sistema radical	5
B.	Tallo	5
C.	Hoja	6
D.	Flor.....	6
E.	Frutos.....	10
2.1.4.	Tipos de plantas	11
A.	Plantas femeninas	11
B.	Plantas hermafroditas	12
C.	Plantas masculinas	12
2.1.5.	Usos	12
2.1.6.	Propagación	13
2.1.7.	Influencia de los genes en el sexo	14
2.1.8.	Marcador	14
A.	Marcador morfológico	14
B.	Marcador molecular	15
2.1.9.	Hibridación tipo Southern	16
2.1.10.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
2.1.11.	Polimorfismo.....	18
2.1.12.	Electroforesis.....	18
2.1.13.	Marcadores moleculares tipo SCAR.....	19
2.2.	Marco referencial.....	20
2.2.1.	Localización.....	20

PÁGINA

2.2.2.	Vía de acceso al municipio y finca.....	21
2.2.3.	Características biofísicas.....	21
A.	Clima.....	21
B.	Zona de vida	21
C.	Suelos.....	21
2.2.4.	Investigaciones de referencia.....	22
3.	OBJETIVOS.....	24
3.1.	Objetivo general	24
3.2.	Objetivos específicos	24
4.	HIPÓTESIS.....	24
5.	METODOLOGÍA	25
5.1.	Identificación del sexo de plantas del híbrido Tainung-1 mediante el marcador molecular SCAR, a los 20 días después de la germinación.....	25
5.1.1.	Material vegetal y vivero.....	25
A.	Selección del material vegetal en vivero.....	26
5.1.2.	Extracción de ADN	26
A.	Elaboración del buffer de extracción CTAB	26
B.	Protocolo de extracción CTAB	27
5.1.3.	Amplificación de ADN.....	28
A.	Selección de cebadores.....	28
B.	Preparación de cebadores.....	29
C.	Cuantificación de la concentración de ADN.....	29
D.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
E.	Electroforesis	31
5.2.	Identificación del sexo de plantas de papaya del híbrido Tainung-1 mediante el marcador basado en la morfología de la flor, 90 a 120 días después de la germinación.	33
5.2.1.	Fase de campo: manejo agronómico	33
A.	Preparación del suelo	33

PÁGINA

B.	Trasplante	33
C.	Fertilización	34
D.	Monitoreo de plagas y enfermedades	35
5.2.2.	Identificación del sexo por morfología de la flor.	35
5.3.	Determinación del porcentaje de predicción entre el marcador molecular tipo SCAR y el marcador morfológico.	36
6.	RESULTADOS	37
6.1.	Identificación del sexo de plantas del híbrido Tainung-1 mediante el marcador molecular SCAR, 20 días después de su germinación.....	37
6.1.1.	Material vegetal y vivero	37
6.1.2.	Extracción de ADN	38
6.1.3.	Amplificación de ADN	40
6.2.	Identificación del sexo de plantas de papaya del híbrido Tainung-1 mediante el marcador basado en la morfología de la flor, 90 a 120 días después de su germinación.....	45
6.3.	Determinación del porcentaje de predicción entre el marcador molecular tipo SCAR y el marcador morfológico.....	47
6.3.1.	Análisis estadístico	50
6.3.2.	Interpretación de segmentos amplificadas	51
6.3.3.	Análisis de eficiencia del material vegetal en uso comercial	52
7.	CONCLUSIONES	54
8.	RECOMENDACIONES	55
9.	BIBLIOGRAFIA	56
10.	ANEXOS	59

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Clasificación taxonómica.	5
Cuadro 2. Análisis químico del fruto de papaya (<i>C. papaya</i> L.), para Latinoamérica.	10
Cuadro 3. Frecuencias expresadas en porcentaje de los diferentes cruces para la obtención de semillas comerciales.	13
Cuadro 4. Reactivos en la elaboración del buffer de extracción CTAB al 3 %.	26
Cuadro 5. Cebadores o Primers seleccionados tipo SCAR.	28
Cuadro 6. Preparación de cebadores en la solución stock a 100 μ M y disolución de trabajo a 10 μ M.	29
Cuadro 7. Reactivos necesarios para realizar una PCR múltiple a un volumen final de 25 μ L.	30
Cuadro 8. Programa de fertilización ocupado en la evaluación.	34
Cuadro 9. Código asignado a 60 plantas utilizadas en la identificación de sexo mediante marcador molecular y marcador morfológico.	38
Cuadro 10. Resultados de la amplificación molecular de 60 muestras vegetales de sexo desconocido tomadas en fase de vivero 20 días después de la germinación.	44
Cuadro 11. Resumen de los resultados en la identificación del sexo mediante marcadores moleculares.	44
Cuadro 12. Resultado de la caracterización sexual basado en la morfología de la flor de 59 muestras tomadas en campo de 90 a 120 días después de la germinación.	46
Cuadro 13. Resumen de los resultados en la identificación del sexo mediante marcadores moleculares.	46
Cuadro 14. Comparación de resultados entre la identificación de sexo mediante el marcador molecular tipo SCAR y marcador morfológico.	48
Cuadro 15. Resumen de resultados de la identificación de sexo mediante marcador molecular tipo SCAR y marcador morfológico y porcentaje de predicción.	48
Cuadro 16. Análisis estadístico de Chi-cuadrado.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. (a.) Partes de la flor femenina (b.) Detalles del estigma.....	7
Figura 2. (A-D) Flor femenina, carente de estambres, precursoras de frutos no comerciales.	7
Figura 3. (a.) Diferentes partes de la flor hermafrodita, (b) detalles de los estambres presentes en flores hermafroditas.	8
Figura 4. (E-H) Flor hermafrodita, presenta cinco pétalos, cinco pares de anteras y un ovario flores precursoras de un fruto alargado con calidad comercial.....	8
Figura 5. Partes de la flor estaminada o masculina de C. papaya.	9
Figura 6. (M-O) Flor masculina o estaminada, se presenta en racimos, carece de gineceo, presenta diez estambres y no produce frutos.	9
Figura 7. Ubicación del cultivo de papaya (C. papaya L.) situado en el municipio de Asunción Mita, Jutiapa.	20
Figura 8. Electroforesis de evaluación de la calidad de ADN.....	39
Figura 9. Electroforesis del desempeño en PCR de los cebadores T1 y W11.	40
Figura 10. Electroforesis del desempeño en PCR múltiple de los cebadores T1/W11.....	41
Figura 11. Resultados de 60 muestras de plantas de sexo desconocido tomada en fase de vivero a 20 días después de la germinación.	43
Figura 12A. Desempeño de los cebadores T1, W11 y T1/W11, en plantas hermafroditas y femeninas.	59
Figura 13A. (A) Bolsa hermética de 1,000 semillas. (B) Semillas. (C) Tratamiento pre-germinativo en agua durante 48 h. (D) Siembra en bandejas de germinación utilizando peat moss como sustrato. (E) Pilonos de 8 días después de la germinación.....	59
Figura 14A. (A) Sustrato (Suelo). (B) Llenado de bolsas de polietileno 6 inch x 9 inch. (C y D) trasplante de pilones a bolsas de polietileno. (E) Plántulas en vivero.	60
Figura 15A. (A y B) Plántulas en vivero, bajo sarán con 70 % de sombra y sin condiciones controladas (expuestas al ambiente).....	60

PÁGINA

Figura 16A. (De A a E) Crecimiento de las plántulas en fase de vivero. (F) Plantas listas para el trasplante.....	61
Figura 17A. (A) Codificación de plantas en vivero. (B) Desinfección con alcohol al 70 % de las herramientas y hielera para el transporte de muestras. (C) Muestras envueltas en papel periódico humedecido y colocadas dentro de bolsas herméticas y codificadas.	61
Figura 18A. (A) Reactivos para la elaboración del medio de extracción CTAB. (B) Maceración de la muestra vegetal. (C) Aplicación del medio de extracción a la muestra macerada. (D y E) Incubación a 65 °C durante 1 h. (F y G) Procedimiento de extracción de ADN. (H) Pastilla de ADN. (I) Cuantificación de la concentración y pureza del ADN....	62
Figura 19A. (A y B) Muestras de ADN (60 muestras). (C y D) Cebadores T1F, T1R y W11F, W11R. (E) Preparación de cebadores. (F) Gotaq Green Master Mix 2X. (G y H) Preparación para la amplificación. (I) Amplificación mediante PCR.	63
Figura 20A. (A) Preparación del molde (nivelado). (B). Gel de agarosa solidificado con los pocillos de carga. (C) Carga del gel dentro de la cámara de electroforesis. (D) Gel de agarosa cargada y tapada (E y D) Cámara de electroforesis conectada y funcionando. (G) Transporte de los productos de amplificación. (H) Revelación de los productos transportados en luz ultravioleta.....	64
Figura 21A. (A) Preparación del terreno. (De B a E) Transporte de las plántulas y trasplante a campo. (F) Codificación de plantas en campo.....	64
Figura 22A. Plantas en campo.	65
Figura 23A. Crecimiento de las plantas en campo, desde el trasplante hasta el momento de la floración.	66
Figura 24A. (A) Inicio de la floración. (B) Floración en plantas femeninas. (C) Floración en plantas hermafroditas.	66
Figura 25A. Perdida de la unidad experimental C3 en campo antes de la floración.	67
Figura 26A. Tabla de valores críticos de distribución de chi-cuadrado.	67

EVALUACIÓN DEL USO DEL MARCADOR MOLECULAR TIPO SCAR EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) HÍBRIDO TAINUNG-1, GUATEMALA, C.A.

EVALUATION OF THE USE OF SCAR MARKERS IN THE IDENTIFICATION OF SEX IN PAPAYA (*Carica papaya* L.) HYBRID TAINUNG-1, GUATEMALA, C.A.

RESUMEN

El cultivo de papaya (*C. papaya* L.) es de importancia nivel nacional, con una producción de 5,000 ha de suelo, distribuidas en seis departamentos y generando ingresos de US\$ 18 millones en comercialización con Estados Unidos. El departamento de Petén concentra la mayor parte de la siembra y comercialización.

El cultivo presenta ventajas como su precocidad, tamaño y sabor, posicionándolo sobre otros frutales. Por otro lado, presenta la desventaja de ser una planta polígama que, al momento de la comercialización, el mercado se decanta por los frutos de plantas hermafroditas por características como tamaño del mesocarpio y endocarpio y por la forma del fruto que genera un traslado de mayor facilidad.

El sexado de la planta que no se puede realizar de manera morfológica durante la etapa de crecimiento vegetativo debido a su similitud, diferenciándose únicamente hasta la etapa de la floración. En la actualidad, el proceso de sexado se desarrolla por un método convencional, se trata de determinar a través de caracteres morfológicos de la flor la identificación del sexo de la planta, este proceso genera pérdidas de material vegetal al eliminar plantas que no poseen un valor comercial.

La evaluación del uso del marcador molecular tipo SCAR en la identificación del sexo en plantas de papaya (*C. papaya* L.) híbrido tainung-1, identificó el sexo de plantas mediante el marcado molecular SCAR a los 20 días después de la germinación, identificó el sexo de plantas basada en la morfología de la flor de muestras obtenidas en campo, 90 a 120 días

después de la germinación (floración) y determinó el porcentaje de predicción del método molecular con respecto al marcador morfológico.

Se seleccionó 59 plantas de 20 días en fase de vivero, se aisló el ADN de hojas utilizando el método de extracción CTAB y se amplificó el segmento de ADN por la técnica de reacción de cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores tipo SCAR T1 y W11, los productos generados fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1 % tiñéndolos con bromuro de etidio en amortiguador TBE 0.50X, se empleó luz UV para visualizar las bandas comparándolas con el marcador de peso molecular para determinar el tamaño indicado.

En etapa de campo, 90 a 120 días, se seleccionó 59 plantas, se recolectó dos a tres flores por planta, se identificó el sexo de las plantas a través de los caracteres morfológicos observados en las muestras florales, por último, se realizó una comparación de resultados en la identificación del sexo basado en el método molecular y los resultados en la identificación del sexo basado en el método morfológico, y así, determinar el porcentaje de predicción del método molecular.

De 59 plantas previamente seleccionadas, se identificó 35 plantas hermafroditas y 24 plantas femeninas por medio del marcador molecular, por parte de método del marcado morfológico, se identificó 36 plantas hermafroditas y 23 plantas femeninas, determinando un 98.30 % de predicción, al coincidir 58 de 59 plantas identificadas, Por lo tanto, los marcadores moleculares tipo SCAR T1 y W11 se comportan de manera confiable en la detección temprana del sexo de plantas hermafroditas y femeninas por lo que puede ser utilizado en la identificación de sexo en el cultivo de papaya híbrido Tainung-1.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de papaya (*C. papaya* L.) en Guatemala posee una importancia significativa, debido a su consumo tanto en el interior del país como en la comercialización internacional, su producción se ha extendido en los departamentos como, Retalhuleu, Escuintla, Zacapa, Izabal, Jutiapa y Petén, siendo este último el departamento de mayor relevancia al concentrar la mayor parte de siembra y comercialización.

C. papaya es una especie polígama, que presenta plantas masculinas o estaminadas, femeninas o pistiladas y bisexuales o hermafroditas en forma separada (Malo y Campbell, 1994). En la comercialización internacional prefieren el consumo de frutos provenientes de plantas hermafroditas debido a características como: tamaño y forma. Los frutos de plantas hermafroditas son alargados, de gran tamaño, con mesocarpio grande y endocarpio reducido, por otro lado, los frutos de plantas femeninas son pequeños, redondos, con mesocarpio reducido y endocarpio grande (Ruano-Roca, 2019), por lo tanto, las plantas femeninas y masculinas no son deseadas en el cultivo y son eliminadas del campo luego de su floración, razón por la cual es valioso determinar el sexo de las plantas.

Aunado a que no es posible predecir el sexo de la planta de manera morfológica durante la etapa de crecimiento vegetativo debido a la similitud, diferenciándose únicamente hasta la etapa de floración momento en el que se eliminan las plantas no deseadas. Esta actividad desencadena pérdidas de material vegetal al productor.

En la predicción de sexos, se ha definido que la semilla comercial proveniente del patrón de segregación del cruzamiento de una planta femenina por una hermafrodita produce una descendencia en proporción 1:1 de cada tipo sexual y el cruce de dos plantas hermafroditas produce una descendencia en proporción 2:1 en hermafrodita y femenina respectivamente. El híbrido comercial Tainung-1, es capaz de producir un aproximado de 33 % de plantas femeninas y 66 % de plantas hermafroditas (proporción 2:1) (García, 2010).

En la actualidad se desarrolla el proceso de identificación sexual por medio del método convencional, que trata de determinar el tipo sexual a través de caracteres morfológicos de la flor, la cual, es posible de realizar hasta los tres o cuatro meses después de la siembra del cultivo, esto genera pérdida de material vegetal.

Mediante la detección temprana del sexo con marcadores moleculares tipo SCAR se puede evitar llevar a campo plantas indeseables, evitando así las pérdidas de recurso vegetal por la eliminación mínima de un 1/3 de las plantas, se ha evaluado el uso de marcadores para la detección temprana del sexo, siendo capaz de detectar plantas hermafroditas y femeninas en 15 a 30 días después de su germinación, logrando llevar a campo un porcentaje de plantas con valor comercial cercano al 100 %, logrando así que la pérdida de plantas se vea reducido a un valor cercano al 0 %, beneficiando de manera directa a todos los agricultores y empresas dedicadas al comercio internacional del fruto de papaya.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Cultivo de papaya (*Carica papaya* L.)

Papaya (*C. papaya* L.), es un cultivo muy apreciado a nivel mundial debido al sabor y apariencia de la pulpa y fruto, además, de su valor nutritivo y una estimación medicinal por el consumidor. Tomando en cuenta su fácil propagación, rápido crecimiento y su abundante fructificación, lo que ha llevado al aumento de su producción durante los últimos años tanto nivel mundial como a nivel nacional.

Para el año 2018, la superficie cultivada a nivel mundial fue mayor a las 442 mil ha traduciéndose a 13.60 millones de T, siendo el país de India quien presentaba el mayor porcentaje de producción, seguido por Brasil. Para los países en vías de desarrollo el cultivo de *C. papaya* se ha convertido en un cultivo importante de exportación, proporcionando mejoras en condiciones de vida dado a su amplia empleabilidad o producción, estos casos han sido reportados en diferentes regiones especialmente en Asia y Latinoamérica (FAO, 2018).

Guatemala no es la excepción del caso, para el año 2017, a nivel nacional se alcanzó un total de 60 mil T traduciéndose en USD 118 millones a nivel de exportaciones a Estados Unidos, siendo Guatemala uno de los principales proveedores con un 21 % del total, únicamente superado por México que posee el 74 % del total, (Sarmiento, 2017). Se estima que actualmente en Guatemala se produce alrededor de 5,000 ha distribuidas en seis departamentos, como lo son: Petén, Retalhuleu, Zacapa, Izabal, Jutiapa y Escuintla, (MAGA, 2017). Guatemala posee un rendimiento medio de 75.74 T/ha, siendo así de los mejores rendimientos a nivel mundial de papaya (Barreno y Marroquin, 2012).

El departamento de Petén es el principal productor en Guatemala debido a que este es considerado libre de la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) siendo viable la exportación de diferentes productos, actualmente se producen alrededor de 1 mil ha, siendo

el híbrido Tainung-1 el principalmente cultivado, además, de Maradol y Hawaiana en pequeñas extensiones de tierra (MAGA, 2017).

La planta de papaya (*C. papaya* L.) es polígama que presenta tres sexos diferentes en plantas separadas, plantas masculinas o estaminadas, femeninas o pistiladas y bisexuales o hermafroditas, posee un ciclo dividido en tres etapas principales, etapa vegetativa, (duración de tres meses a cuatro meses, desde la siembra hasta la floración), etapa de floración, (duración de ocho meses, desde la floración hasta el inicio de la cosecha) y etapa de cosecha (duración de ocho o nueve meses).

En la comercialización internacional prefieren el consumo de frutos provenientes de plantas hermafroditas debido a características como, tamaño y forma. Los frutos de plantas hermafroditas son alargados, de gran tamaño, con mesocarpio grande y endocarpio reducido, por otro lado, los frutos de plantas femeninas son pequeños, redondos, con mesocarpio reducido y endocarpio grande (Ruano-Roca, 2019), las plantas femeninas y masculinas no son deseadas en el cultivo y son eliminadas del campo.

La selección de plantas se realiza en el momento de la floración, de tres a cinco meses después de la siembra del cultivo, la selección consiste en identificar el sexo de las flores a partir de los caracteres de la flor, el tipo sexual de la flor corresponde al tipo sexual de la planta, debido a que, es una especie dioica, que se expresan en plantas unisexuales (poseen flor en base al sexo de la planta). A partir de la identificación sexual se realiza la eliminación de plantas sin el valor comercial requerido, esto genera pérdida de material vegetal de al menos un 33 % del total.

2.1.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica de la planta de papaya (*C. papaya* L.) se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Caricaceae
Genero	Carica
Especie	<i>Carica papaya</i> L.

Fuente: elaborado con base CONABIO, 2009.

2.1.3. Componentes de la planta

A. Sistema radical

Presenta una raíz principal pivotante que puede alcanzar hasta un metro de profundidad. A partir de la raíz pivotante, se desarrollan las raíces secundarias que pueden alcanzar un promedio de 0.80 m de radio, aunque la mayor concentración de estas se encuentra en los primeros 0.20 m (García, 2010).

B. Tallo

Posee un tallo hueco que suele alcanzar hasta 5 m de altura en varios ciclos agrícolas y desarrolla un diámetro de 0.10 m a 0.30 m en la base y de 0.05 m a 0.10 m en la corona de la planta. El desarrollo del tallo es de un solo eje donde presenta yemas con la capacidad de formar ramas, este tallo debe ser fuerte con diámetro adecuado, con la capacidad de soportar grandes cantidades de frutos (García, 2010).

C. Hoja

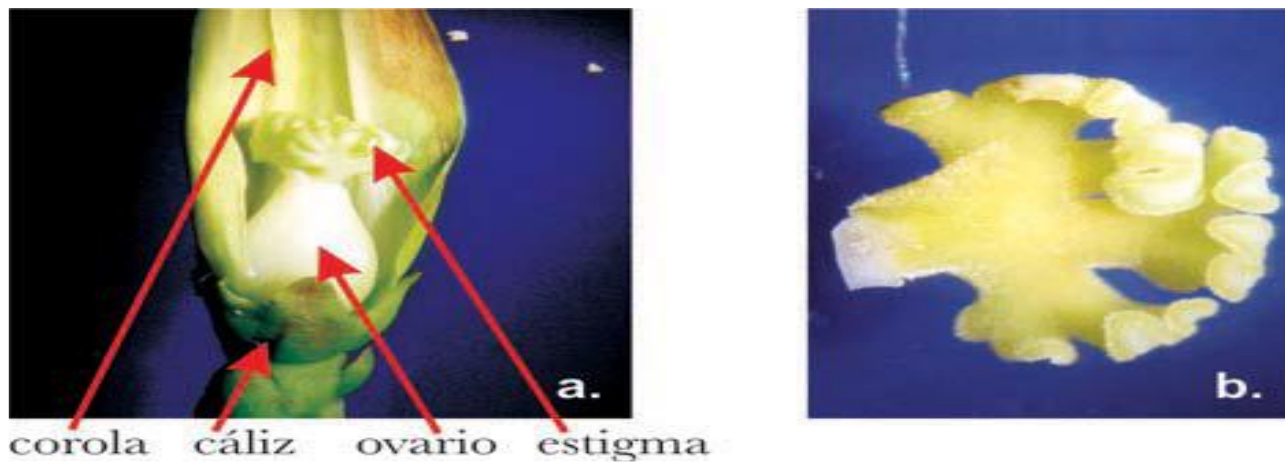
Las hojas del cultivo poseen de siete a once lóbulos, se desarrollan a lo largo del tallo durante el crecimiento, las hojas recientes siempre se encuentran en la parte superior, las cuales están adheridas al tallo por un peciolo de 0.25 m a 1 m de longitud, poseen un limbo de 0.25 m a 0.75 m. Las hojas pueden ser abortadas de manera natural o bien ser removidas por manejo cultural, se recomienda que una planta posea al menos 30 hojas funcionales, que cada una representa el 3 % o 4 % del área fotosintética total (Ruano-Roca, 2019).

D. Flor

Son flores actinomorfas que se forman cerca del ápice del tronco, poseen una longevidad de tres días a cuatro días y están dispuestas en inflorescencias en la unión de la hoja con el tallo. La polinización es principalmente entomófila por polillas, escarabajos, abejas entre otros (Ming y Moore, 2014). La especie *C. papaya* suele presentar tres tipos de inflorescencias, por su tipo de flores que dependerá del sexo de la planta, de tal manera se distinguen los siguientes tipos de flor:

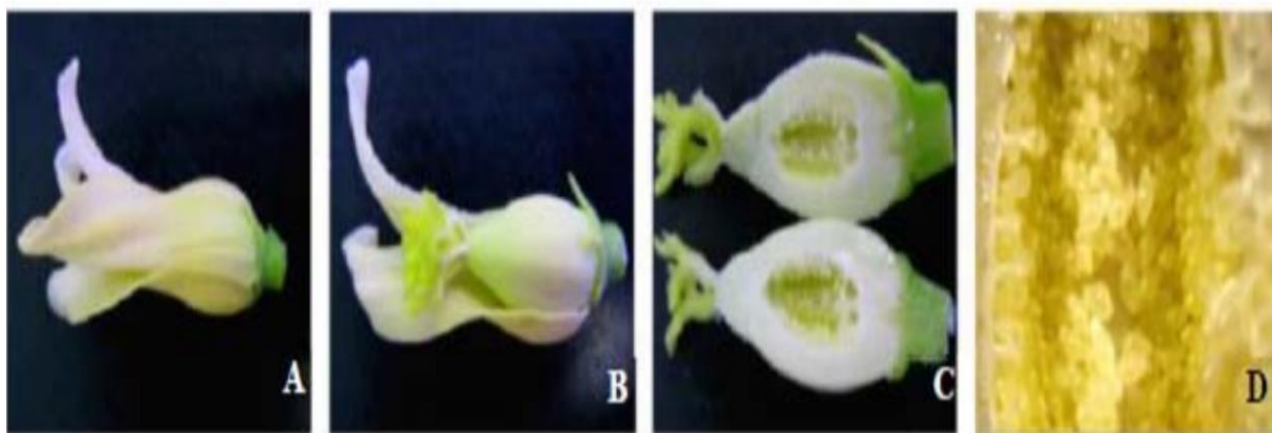
a. Flor femenina

Se caracterizan por poseer un cáliz corto, cinco sépalos y pétalos blancos completamente libres, no poseen estambres como se observa en la figura 1. El pistilo está formado por un ovario elipsoidal liso por lo general es grande, formando cinco carpelos unidos, poseen estigma grande y recortado, observado en la figura 2 (Gil y Miranda, 2005).



Fuente: Gil y Miranda, 2005.

Figura 1. (a.) Partes de la flor femenina (b.) Detalles del estigma.

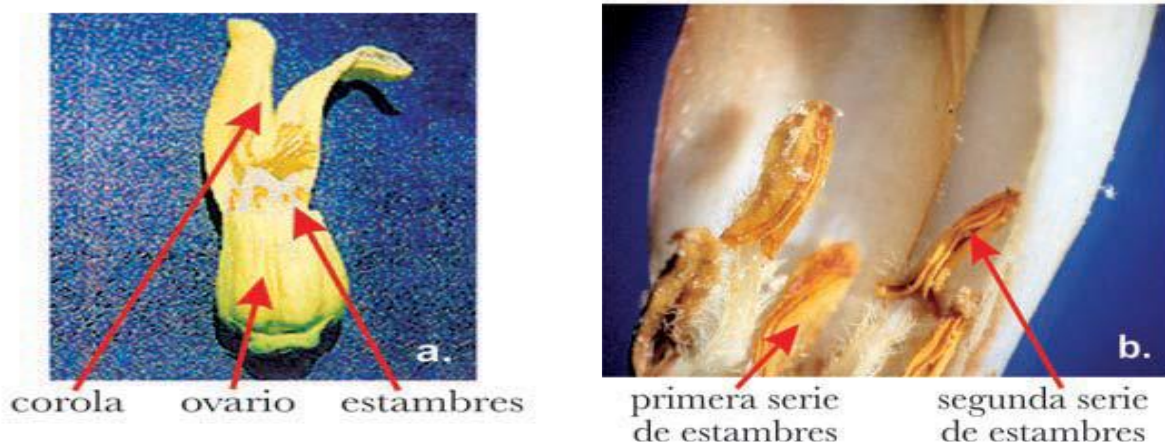


Fuente: Ruiz *et al.* 2017.

Figura 2. (A-D) Flor femenina, carente de estambres, precursoras de frutos no comerciales.

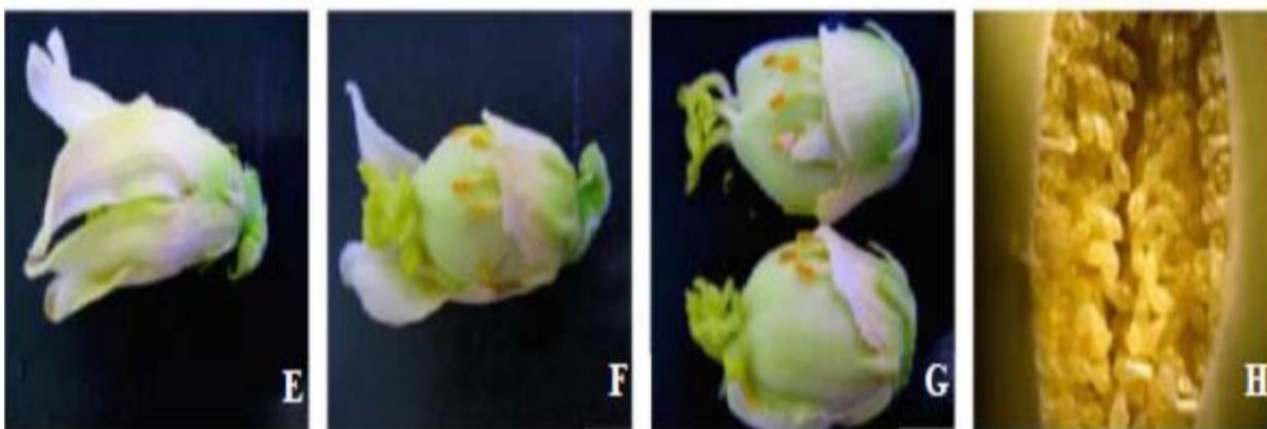
b. Flores hermafroditas

Presenta cinco pétalos unidos en más de un tercio, estambres situados al final del tubo de la corola, en dos series de cinco respectivamente, los segundos con filamento corto que salen del borde de los pétalos, el pistilo posee un ovario alargado y grande, observado en las figuras 3 y 4 (Gil y Miranda, 2005).



Fuente: Gil y Miranda, 2005.

Figura 3. (a.) Diferentes partes de la flor hermafrodita, (b) detalles de los estambres presentes en flores hermafroditas.

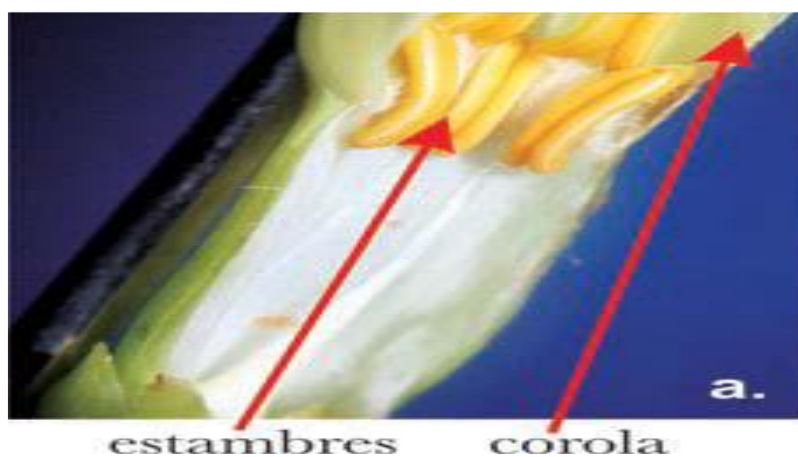


Fuente: Ruiz et al. 2017.

Figura 4. (E-H) Flor hermafrodita, presenta cinco pétalos, cinco pares de anteras y un ovario, flores precursoras de un fruto alargado con calidad comercial.

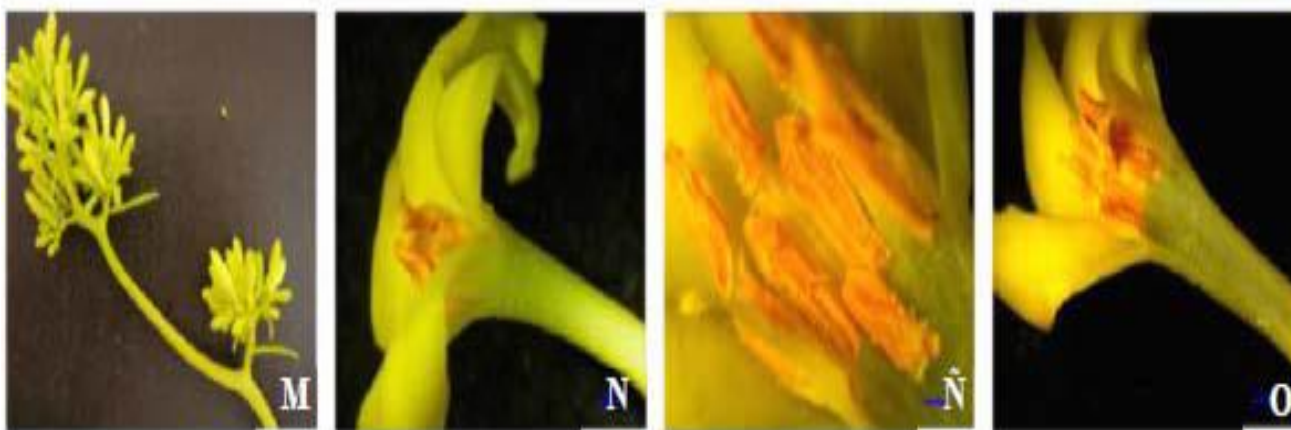
c. Flores estaminadas o masculinas

Son flores delgadas y largas, poseen un tubo elongado y cinco pétalos cortos, poseen diez estambres y un ovario rudimentario que en muy pocos casos puede volverse funcional generando un fruto pequeño y de mala calidad, observado en la figura 5 (Gil y Miranda, 2005). Se presenta en inflorescencias agrupadas en panículas de pedúnculos largos y colgantes, como se observa en figura 6 (Vásquez, 2010).



Fuente: Gil y Miranda, 2005.

Figura 5. Partes de la flor estaminada o masculina de *C. papaya*.



Fuente: Ruiz et al. 2017.

Figura 6. (M-O) Flor masculina o estaminada, se presenta en racimos, carece de gineceo, presenta diez estambres y no produce frutos.

E. Frutos

Es una baya cilíndrica alargada, en forma globular oval o redondo, la forma de los frutos depende de la variedad y el tipo de flor de la que proviene. Según distintas variedades o híbridos los frutos alcanzan de 0.15 m a 0.30 m de longitud y de 0.12 m a 0.25 m de diámetros y un rango de peso de 0.22 kg a 11.50 kg o más. La pulpa es rica en contenido de agua, azúcares, vitaminas, minerales y sustancias colorantes, como se expresa en el cuadro 2. Su color suele variar de amarillo pálido a amarillo rojizo.

Cuadro 2. Análisis químico del fruto de papaya (*C. papaya* L.), para Latinoamérica.

COMPONENTE	FRUTO MADURO	FRUTO VERDE
Valor energético	92 cal	28 cal
Humedad	90.70 %	91.60 %
Proteína	0.10 %	0.10 %
Carbohidratos	8.30 %	6.90 %
Fibra	0.60 %	0.80 %
Ceniza	0.40 %	0.60 %
Calcio	20 mg	41 mg
Fósforo	13 mg	22 mg
Hierro	0.40 mg	0.30 mg
Vitamina A	110 mcg	0 mcg
Tiamina	0.03 mg	0.04 mg
Riboflavina	0.30 mg	0.20 mg
Niacina	46 mg	6 mg
Ácido ascórbico	46 mg	6 mg

Fuente: elaborado en base a García, 2010.

En condiciones ambientales extremas como altas temperaturas y baja humedad en el sitio del cultivo, se presentan una serie de anomalías en frutos que provienen de flores y plantas hermafroditas, como las siguientes:

a. Frutos pentándricos

La flor tiende a desarrollar canales pronunciados que hace que el fruto pierda estética, además, de un endocarpio grueso y mesocarpio delgado, siendo así una fruta no comercial (García, 2010).

b. Fruto carpeloíde

En este fruto los carpelos se adhieren al ovario causando su deformación, los frutos se conocen de forma coloquial como “cara de gato”, en ocasiones la flor se deforma tanto que es abortada antes de la fecundación (Jiménez, 2002; García, 2010).

2.1.4. Tipos de plantas

El sexo que presentan determina el tipo de planta, es un factor influenciado únicamente por el genoma. La especie posee tres tipos de plantas diferentes: plantas machos o masculinas, plantas hembras o femeninas y plantas hermafroditas (Jiménez, 2002).

A. Plantas femeninas

Son plantas que producen entre dos y quince flores femeninas y requieren la presencia de polen de otras plantas en el ambiente para su fecundación y producción de frutos, en ocasiones forman frutos sin necesidad de la polinización a lo que se le denomina partenocarpia (García, 2010). Este tipo de planta forma frutos pequeños y redondos con un endocarpio grande, por lo que no son aceptados de forma comercial a nivel internacional,

la mayoría de productores eliminan este tipo de planta durante la práctica del sexado (Ruano-Roca, 2019).

B. Plantas hermafroditas

Estas son plantas que producen entre dos y quince flores hermafroditas, capaces de producir frutos de forma alargadas u oblongas y endocarpio reducido. Las flores aparecen en inflorescencias axilares de cinco o más, con un pedúnculo intermedio (Jiménez, 2002). La planta hermafrodita es el tipo de planta que produce frutos de mayor calidad a nivel comercial, por lo que al momento del sexado se busca dejar la mayoría de plantas hermafroditas (Ruano-Roca, 2019).

C. Plantas masculinas

Son plantas que producen de docenas hasta cientos de flores masculinas y se caracterizan por la formación de inflorescencia en racimos, denominadas como cimas. Las flores poseen un ovario rudimentario en ocasiones produce frutos pequeños sin valor comercial, por lo que se prefiere eliminar este tipo de plantas en las fincas productoras (Jiménez, 2002; García, 2010).

2.1.5. Usos

En el mercado local su principal uso es su consumo en fresco o en diferentes derivados, para el mercado internacional se ofrece una industrialización obteniendo productos como: papaína, pectina, esencias, aceites, néctares, mermelada, jugos, entre otros. También es utilizada en la industria medica en tratamientos como insuficiencias gástricas y duodenales, elaboración de medios de cultivo, ablandadores de carnes, jarabes entre otros (García, 2010).

2.1.6. Propagación

El método de propagación más utilizado es por semilla, en el cual se realizan viveros para su posterior trasplante. En este método no se consigue obtener el 100 % de plantas hermafroditas que es lo que buscan los productores, por lo que se han realizado diversos estudios con el fin de aumentar el porcentaje de plantas hermafroditas a través de diferentes cruces, mostrado en el cuadro 3. En cruces con presencia de polen de flores masculinas provoca una descendencia de plantas masculina, por lo que se evita este tipo de polinización en cruces destinadas a extracción de semillas para producción y comercialización (García, 2010).

Cuadro 3. Frecuencias expresadas en porcentaje de los diferentes cruces para la obtención de semillas comerciales.

Polinización	Femenina (F) %	Hermafrodita (Hm) %	Masculina (M) %
F x M	50	0	50
F x Hm	50	50	0
Hm x Hm	33	66	0
M x Hm	33	33	33

F: plantas femeninas; Hm: plantas hermafroditas; M: plantas masculinas.

Fuente: García, 2010.

Tainung-1 al ser un híbrido, es capaz de producir un aproximado de 66 % de plantas hermafroditas debido a que proviene de cruces Hm x Hm (García, 2010). Según lo reportado por Alonso *et al.* (2009), menciona que se realizaron dos evaluaciones para Tainung-1 en los años 2006 y 2007, se obtuvieron 68.20 % y 65.30 % de plantas hermafroditas y 31.80 % y 34.70 % de plantas femeninas respectivamente.

2.1.7. Influencia de los genes en el sexo

El sexo de las plantas de papaya (*C. papaya* L.) está influenciado por un solo gen con tres alelos los cuales exhiben un efecto pleiotrópico, es decir, que solo un gen puede afectar a los diferentes fenotipos sexuales. Cabe resaltar que las combinaciones de alelos dominantes son letales en la especie, por ejemplo, si los alelos masculinos son representados por “M”, hermafroditas por “MH”, y femeninas por “m”. Todas las plantas que segreguen los alelos “MM”, “MHMH” y “MHM” morirán, por lo tanto, las plantas masculinas y hermafroditas suele ser heterocigotos obligados, con un genotipo viable de “Mm” & “MHm” respectivamente, por último, para plantas femeninas serán “mm” (Storey, 1953).

2.1.8. Marcador

Un marcador es una biomolécula o un carácter que debido a su ligamiento puede utilizarse para indicar la presencia de un gen, es decir, un gen específico, una proteína, un estilo de hoja, un tipo de flor, etc. puede indicar la asociación a la presencia o expresión de otra característica de importancia, como lo es, el vigor, la resistencia a enfermedades u otras condiciones, altura, mayor productividad entre otros. Por lo que se le denomina como marcador, debido a que la presencia de una, necesariamente implica la presencia de la otra (Nuez y Carrillo, 2000).

A. Marcador morfológico

Se le denomina marcador morfológico a los distintos caracteres fenotípicos de fácil identificación visual como la forma, el color, tamaño, altura entre otros, que se expresan en un ambiente específico y permite al hombre separar un individuo de un grupo de plantas (Picca *et al.* 2004).

Los marcadores morfológicos son utilizados para estimar la variación morfológica de una población, sin embargo, presentan diferentes limitaciones en su uso. La principal limitación es precisamente que se basa en la morfología expresada en el individuo, las cuales son

fuertemente influenciadas por el ambiente en el que se desarrolla y que generalmente se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005).

B. Marcador molecular

Los marcadores moleculares corresponden a un gen cuya expresión permite un efecto fenotípico fácilmente cuantificable u observable, este tipo de marcadores pueden evaluarse desde las primeras etapas de crecimiento hasta las últimas etapas de la planta y es aplicable en todo el individuo o bien en una parte de este. Los marcadores moleculares genéticos suelen transmiten en base a las leyes de la herencia mendeliana, por lo tanto, no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos, siendo así, se dividen en dos tipos, marcadores bioquímicos y marcadores de ADN (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005).

a. Marcadores bioquímicos

Dentro de los marcadores bioquímicos se incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas, estos fueron el primer tipo de marcadores moleculares, debido a que las proteínas son producto primario de los genes, formado mediante el proceso de transcripción-traducción del ADN, siendo menos influenciado por el ambiente externo del individuo. Estos marcadores poseen la ventaja de ser de costo menor, son de fácil accesibilidad y que necesitan menor material de muestra para elaborarse (Wilches, 2004).

Además, el control genético de la mayoría de isoenzimas o aloenzimas, han sido reportados, lo que hace posible realizar inferencias genéticas a partir de los geles posterior a la electroforesis. Por otro lado, los marcadores bioquímicos poseen una base genética codominante, es decir, que en un individuo diploide es posible observar la expresión en ambos alelos, además, posee un efecto pleiotrópico, esto indica que un gen controla la expresión de más de un carácter en el individuo, por último, los marcadores bioquímicos suelen ser selectivamente neutrales y están libres de efectos deletéreos, indicando que los

alelos tienen efectos adversos que impiden la reproducción del genotipo que los forma (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005).

b. Marcadores de ADN

Los marcadores moleculares de ADN son más recientes en comparación a los marcadores bioquímicos y actualmente se puede generar una cantidad infinita de marcadores de ADN, para la detección o identificación de estos marcadores existen varias técnicas, como lo son: la hibridación tipo Southern, la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y la combinación entre estos (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005).

Un marcador de ADN se define como una porción de ADN con ubicación física identificable dentro del cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser el segmento o el gen completo en estudio con o sin función conocida. Debido a que los segmentos de ADN se encuentran juntos dentro del cromosoma estos tiende a heredarse juntos, siendo utilizados para el rastreo del patrón hereditario de un gen que aún no ha sido identificado de forma directa, pero cuya ubicación aproximada se conoce (Franco, 2020).

Son muy utilizados en diferentes ámbitos por ejemplo en la genética humana y animal en detección de enfermedades y otros, en genética vegetal en detección de resistencias, productividad, sexo entre otros y en genética microbiana en detección de presencia de genes. Además, permiten observar las diferentes variaciones polimórficas entre las secuencias de ADN de los diferentes individuos en estudio, ya sea que modifiquen o no su fenotipo (Franco, 2020).

2.1.9. Hibridación tipo Southern

La hibridación se basa en la formación de una molécula bicatenaria mediante la unión de bases complementarias de dos moléculas monocatenarias. La hibridación tipo Southern observa las variaciones de tamaño de los fragmentos de ADN ocasionadas por la restricción del genoma mediante endonucleasa. Este proceso se divide en diferentes etapas:

- Extracción de ADN del material genético a estudiar.
- Adición de las endonucleasas, las cuales fragmentan el ADN en diferentes longitudes, que posterior son separados en geles de agarosa para después realizar por capilaridad la transferencia de fragmentos a una membrana de papel de nitrocelulosa (tipo Southern).
- Hibridación de los fragmentos de la membrana con sondas marcadas para visualizar y detectar las bandas.

Dentro de esta técnica se encuentran algunos marcadores moleculares como lo son: marcadores RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable) (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005).

2.1.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction, es una técnica utilizada para amplificar segmentos de secuencias de ADN, este método utiliza secuencias cortas de ADN denominados cebadores o primers que ayudan a seleccionar la región del genoma a amplificar para formar millones de copias del segmento flanqueado. La técnica de PCR se basa en la utilización del calor por características de estabilidad de la enzima polimerasa al calor, en el cual, la temperatura se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima ADN polimerasa y duplicar la secuencia del ADN, siendo así en todos los ciclos (NIH, 2019).

El PCR suele ser aplicado en muchos campos, por ejemplo, en la arqueología, en la medicina forense, medicina clínica y en la agricultura, en la detección de presencia de genes, siendo una técnica de alta confiabilidad (Megía, 2020). Esta técnica es utilizada en marcadores moleculares de ADN como, por ejemplo, RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), PCR iniciada con microsatélites (MP-PCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del ADN), SCAR (región amplificada caracterizada por secuencia), entre otros (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005).

Etapas del PCR

- Desnaturalización: se refiere a la separación de la doble cadena de ADN con temperaturas superiores a 90 °C.
- Alineamiento: es la etapa donde los iniciadores, cebadores o primers se alinea al segmento de ADN de secuencia complementaria. Este proceso se realiza en temperaturas de 55 °C a 65 °C.
- Extensión: etapa también conocida como polimerización, es en donde la Taq polimerasa realiza su trabajo a partir del cebador, a una temperatura promedio de 72 °C. Los nucleótidos que están libres en la solución se unen mediante la Taq pol y se forman segmentos de ADN definitivos.

Todas estas etapas se repiten en forma de ciclos en un termociclador, como recomendación se repiten en 30 ciclos, posteriormente, los resultados son observables mediante el proceso de electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida (Wilches, 2004).

2.1.11. Polimorfismo

El polimorfismo se refiere al lugar dentro de la secuencia de ADN donde existe una variación, esta variación puede darse en un solo nucleótido o bien en un segmento corto de nucleótidos que puede estar presente o ausente de la secuencia en comparación. Es utilizado para observar las variaciones o la diversidad de genomas entre individuos o especies. Los resultados son expresados en distintos patrones de bandas obtenidos del proceso de electroforesis (Collins, 2020).

2.1.12. Electroforesis

Es una técnica utilizada para la separación de biomoléculas, aplicando una corriente eléctrica, la cual provoca un movimiento de moléculas en base a su tamaño, para esto se utiliza una base sólida hidratada como lo es el acetato de celulosa, geles o bien otras soluciones y se realiza en una especie de caja que tiene una carga positiva en un extremo

y carga negativa en el otro. Las biomoléculas como el ADN con carga negativa son atraídas hacia la carga positiva, los fragmentos más pequeños se moverán más que los grandes, formando lo que se le denomina “patrones de banda”.

Las principales aplicaciones de la electroforesis son la medicina animal, humana y la agricultura, en la detección de identidad de organismos mediante un patrón de bandas según el tamaño de la molécula y así realizar la comparación con una base de datos (Austin, 2020).

2.1.13. Marcadores moleculares tipo SCAR

Los marcadores moleculares tipo SCAR por sus siglas en inglés Sequence Characterized Amplified Region, (región amplificada caracterizada por secuencia), son marcadores de ADN que se derivan de una banda de interés obtenida por técnicas moleculares como: RAPD, RLP o AFLP, es secuenciada para el diseño de un cebador o primer específico que se acopla a un fragmento del genoma de interés.

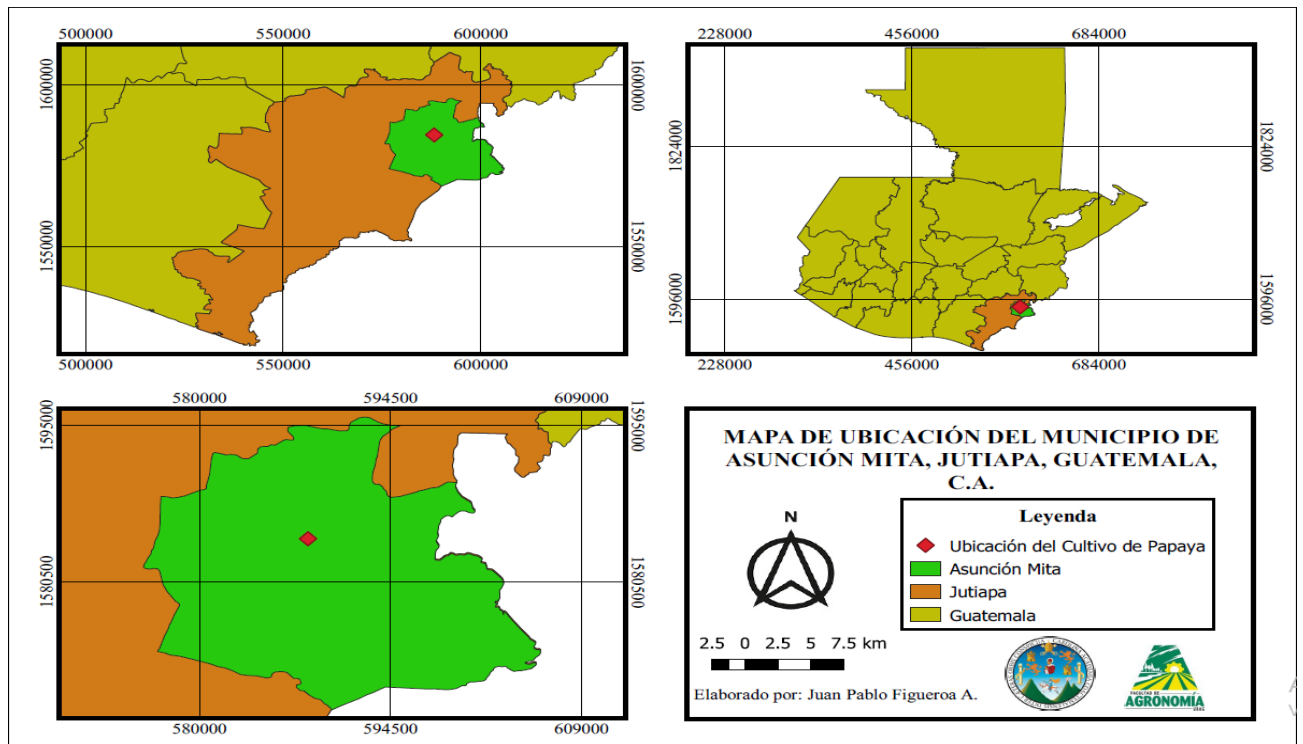
Estos cebadores suelen poseer de 15 pb a 23 pb, son bicatenarios con secuencia de ADN diferente y se acoplan a un lugar definido, es decir que, son altamente específicos para un sitio del genoma que posteriormente lo amplifican por medio de PCR y producen una banda que marca un carácter deseado en la planta en el proceso de electroforesis. Son aplicados en la identificación de genes, incluyendo recesivos que generalmente son difíciles de observar por otros métodos con una precisión alta (Aranda, 2000).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Localización

La etapa de campo se estableció en la finca “El Tule”, ubicada en la aldea El Tule en el municipio de Asunción Mita en el departamento de Jutiapa en Guatemala. La finca está ubicada a 153 km de la ciudad de Guatemala, en las coordenadas 14° 19' 38.20" latitud norte y 89° 40' 54.30" longitud oeste. Cuenta con una extensión de 4.90 ha y una elevación de 465 m s.n.m. (Segeplan, 2020). Observado en figura 7.

La fase de evaluación genética se efectuó en el laboratorio B-12 de biotecnología, edificio de unidad de vinculación y gestión de recursos (UVIGER), ubicado en la universidad de San Carlos de Guatemala, zona 12, ciudad de Guatemala, Guatemala. En las coordenadas 14° 34' 58.50" latitud norte y 90° 33' 12.10" longitud oeste a 9.70 km del centro de la ciudad.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 7. Ubicación del cultivo de papaya (*C. papaya* L.) situado en el municipio de Asunción Mita, Jutiapa.

2.2.2. Vía de acceso al municipio y finca

El acceso al municipio de Asunción Mita es mediante la carretera CA-1 a El Salvador, transitando por el departamento de Santa Rosa y posteriormente Jutiapa, a 30 km de la cabecera municipal a la altura del km 145 se encuentra el municipio. La vía de acceso a la finca es mediante la calle principal del municipio, dobla a la izquierda en el km 145 y continua hasta llegar a la aldea El tule, 1 km más adelante al lado derecho se encuentra la finca.

2.2.3. Características biofísicas

A. Clima

Según los datos históricos de estaciones meteorológicas reportadas por Instituto nacional de estadística (2013), se determina que, la época lluviosa inicia en el mes de mayo y finaliza en el mes de octubre, en el cual, se registran una media de 1,160 mm de precipitación al año (Climate-data.org, 2020). En cuanto a la época seca inicia en el mes de noviembre hasta el mes de abril, además, se registran temperaturas máximas de 42 °C, temperaturas mínimas de 22 °C y temperatura media de 28 °C. Según el sistema de clasificación climática de Köppen es catalogado como clima tropical (Köppen, 1918).

B. Zona de vida

El municipio se encuentra ubicado en la zona de vida “Bosque seco tropical” (bs-T) según el sistema de clasificación de Holdridge (SIMSAN, 2020).

C. Suelos

En el municipio de Asunción Mita existen dos tipos de suelos, el franco arenoso y arcilloso. En la parte baja por el depósito de los ríos y arcilla, se encuentran los arcillosos, cada tipo de suelo tiene vocación diferente, en las partes altas para la siembra de sorgo, maíz, sandía

y frijol, en las partes bajas para el cultivo de árboles frutales, hortalizas y granjas, los suelos son profundos y bien drenados, los cuales se consideran fértiles (Palacios *et al.* 2013).

2.2.4. Investigaciones de referencia

A nivel internacional, se han realizado diferentes estudios por diversos autores con relación al tema en evaluación, sin embargo, en Guatemala, no se encuentra información disponible respecto al tema.

A. En México, se realizó la “Evaluación de marcadores moleculares en la predicción temprana de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) de tipo hermafrodita var. Maradol en la zona Costa de Oaxaca” publicado por Ruiz *et al.* (2017). En el documento publicado destacan el proceso de sexado por dos vías, vía morfológica y vía genética, bajo el objetivo de realizar un sexado temprano de plantas antes de llegar a la floración y el coste del proceso de identificación sexual. Para lograr el objetivo se utilizaron marcadores moleculares tipo SCAR utilizando cebadores o primers T1, T12 y W11.

El cebador T1 es utilizado como control positivo y los cebadores T12 y W11 son utilizado para amplificar un fragmento exclusivo para plantas hermafroditas, se evaluó la variedad de maradol (variedad con mayor producción en México), se recolectó 228 muestras de plantas para el análisis. El resultado fue, el 100 % de predicción del tipo sexual en la comparativa entre la metodología molecular y metodología convencional, además se determinó el costo de la herramienta molecular para la identificación del sexo de cada planta, de 45.76 pesos mexicanos por planta identificada (Ruiz *et al.* 2017).

B. En Colombia, se realizó la “Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya”, publicado por Sánchez-Betancurt y Nuñez-Zarantes, (2008). El documento publicado destaca la identificación temprana del sexo de las plantas mediante el uso de marcadores moleculares tipo SCAR utilizando primers o cebadores como: SCAR-SDSP, T1 & W11, registrados como secuencias específicas

para discriminar el sexo en papaya (*C. papaya* L.). En el cual, el cebador SCAR-SDSP es capaz de amplificar un segmento de 369 pb en plantas hermafroditas, el cebador T1 amplifica un segmento de 1,300 pb en plantas hermafroditas y hembras, por último, el cebador W11 amplifica 800 pb en plantas hermafroditas.

Se tomó 28 muestras vegetales de diferentes variedades, provenientes de diferentes cultivos comerciales y concluyó que al utilizar los marcadores T1 y W11 en PCR multiplex se logró diferenciar plantas hembras con hermafroditas con una confiabilidad del 99 % al momento de discriminar el sexo en las diferentes variedades utilizadas (Sánchez-Betancourt y Nuñez-Zarantes 2008).

- C. En Estados Unidos, se documentó el desarrollo del marcador molecular tipo SCAR (cebadores T1, T12 y W11), en la identificación temprana del sexo en papaya, publicado por, Deputy *et al.* (2002). Para el desarrollo de los marcadores moleculares, se encargó de tomar muestras de ADN de 25 plantas hermafroditas y de 25 plantas femeninas de una generación F2 de un cruce entre papaya hawaianas de la variedad “Sunrise” y “UH line 365”, se utilizaron las reacciones RAPD-PCR y se analizaron los productos de reacción por electroforesis en geles de agarosa al 1.50 %. Posterior, se realizó la clonación de 3 productos de RAPD y se secuenció una parte del ADN. Basándose en las secuencias obtenidas, se sintetizaron los cebadores SCAR. SCAR T12 y W11 que producen productos en plantas hermafroditas y masculinas, SCAR T1 produce un producto en todas las papayas independientemente del sexo.

Con base en estos resultados, se desarrolló una técnica basada en PCR múltiple para determinar de manera rápida y precisa el sexo de las plantas de papaya utilizando los cebadores W11 o T12 para detectar el alelo hermafrodita o masculino y el cebador T1, que amplifica un producto independientemente del tipo de sexo, como control positivo. En la evaluación, recolectó 750 muestras vegetales para predecir el tipo sexual de la planta, acertando 744 plantas, y así, obteniendo una precisión del 99.20 % del total (Deputy *et al.* 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el uso de los marcadores moleculares tipo SCAR en la identificación del sexo en plantas de papaya (*C. papaya* L.) híbrido Tainung-1.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar el sexo de plantas de papaya Tainung-1 mediante el marcador molecular SCAR, a los 20 días después de la germinación.
2. Identificar el sexo de plantas basada en la morfología de la flor de muestras obtenidas en campo, a los 90 a 120 días después de la germinación.
3. Determinar el porcentaje de predicción del método del marcador molecular con respecto al método del marcador morfológico.

4. HIPÓTESIS

La detección temprana del sexo en las plantas de papaya (*C. papaya* L.) mediante el uso de técnicas alternativas como el uso del marcador molecular tipo SCAR, ayuda al uso eficiente de material vegetal, en comparación del método de selección convencional.

5. METODOLOGÍA

5.1. Identificación del sexo de plantas del híbrido Tainung-1 mediante el marcador molecular SCAR, a los 20 días después de la germinación

5.1.1. Material vegetal y vivero

En la identificación del sexo mediante el marcador molecular tipo SCAR, se utilizó el híbrido Tainung-1 en etapa de vivero. La fase de vivero se realizó en bandejas de germinación de 105 celdas y en bolsas de polietileno, cubiertas por un sarán del 70 % de sombra y expuestas al ambiente (sin condiciones controladas).

La primera fase de la etapa de vivero inició el 21 de octubre de 2020:

- Se llenó dos bandejas de germinación de 105 celdas con peat moss, siendo un total de 210 celdas.
- Se realizó un proceso de pregerminación colocando las semillas en agua durante 48 h.
- Se sembró 1 semilla de papaya por cada celda de las bandejas de germinación (210 semillas).
- Se aplicó riego cada 3 días con atomizador.

Fecha final de primera fase de la etapa de vivero fue el 08 de noviembre de 2020, con duración de 18 días. (8 días después de la germinación).

La segunda fase de la etapa de vivero inició el 09 de noviembre de 2020, donde se realizó:

- El sustrato mezclando arena, suelo y materia orgánica en relación 1:1:1
- La desinfección del suelo con imidazol-procloraz más flalimida-folpet.
- Llenado de 200 bolsas de polietileno para almacigo de 6 inch x 9 inch con el sustrato previamente mezclado y desinfectado.
- El trasplante de las bandejas de germinación a las bolsas de polietileno.

Fecha final de la segunda fase de la etapa de vivero fue 2 de diciembre de 2020, con duración de 24 días, posteriormente, fue trasladado de vivero a campo. (32 días después de la germinación).

A. Selección del material vegetal en vivero

El 20 de noviembre de 2020, 20 días después de la germinación en etapa final de vivero:

- Se realizó la codificación de 60 muestras vegetales con una letra y un número correlativo. Este código se mantuvo desde la fase de vivero hasta la fase de campo (durante la identificación genética e identificación morfológica).
- Se recolectó, dos o tres hojas desarrolladas de cada plántula con la ayuda de una tijera.
- Se realizó una desinfección con alcohol al 70 % de las herramientas utilizadas.
- Las muestras recolectadas, se colocaron en papel periódico humedecido con agua destilada.
- Se colocó en bolsas herméticas identificadas con el código asignada a la planta.
- Se trasladó en una hielera debidamente refrigerada (con hielo) hacia el laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía.

El tiempo transcurrido desde la toma del material vegetal hasta el análisis genético en el laboratorio de biotecnología fue menor a 24 h.

5.1.2. Extracción de ADN

A. Elaboración del buffer de extracción CTAB

Se preparó 30 ml del buffer de extracción CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 3 %, los reactivos y concentraciones son expuestos en el cuadro 4.

Cuadro 4. Reactivos en la elaboración del buffer de extracción CTAB al 3 %.

Reactivo	Concentración de la solución stock	Concentración final
CTAB	10 %	3 %
EDTA	0.10 M	20 mM

Continuación cuadro 4.

Tris HCL p ^H 8	0.75 M	100 mM
NaCl		1.40 M
Polivinilpirrolidona (pvp)	5 M	1 %
Mercaptoetanol		0.20 %
H ₂ O destilada		Aforar

Fuente: elaboración propia, 2021.

B. Protocolo de extracción CTAB

Del material vegetal colectado previamente:

- Se tomó una sección de hoja de 5 mm² y se colocó en un tubo eppendorf de 1.50 ml.
- Se le agregó 500 µL de buffer de extracción CTAB y se procedió a macerar con un micro-pistilo. Se agitó la muestra en un vortex durante 1 min.
- Se dejó incubar por 1 h a una temperatura de 65 °C, realizando una mezcla por inversión a los 30 min, posterior, se refrigeró durante 15 min.
- Se dejó descongelar en temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.50 ml.
- Se agregó 500 µL de cloroformo mezclado con isomilpropanol en relación 24:1 respectivamente y se mezcló por inversión 50 veces.
- Se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm, se traspasó la fase clara a un nuevo tubo eppendorf de 1.50 ml y se descartó la fase líquida precipitada.
- Se agregó 500 µL de cloroformo mezclado con isomilpropanol en relación 24:1 respectivamente y se mezcló por inversión 50 veces.
- Se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm, se traspasó la fase clara a un nuevo tubo eppendorf de 1.50 ml y se descartó la fase líquida precipitada.
- Se agregó 400 µL de isopropanol y se mezcló por inversión 50 veces.
- Se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm, desechando el sobrenadante y encontrándose la pastilla de ADN al fondo del tubo.

- Se agregó 400 µL de etanol al 70 % mezclando por inversión por 25 veces para realizar un lavado de la pastilla de ADN
- Se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm, invirtiendo luego los tubos para descartar el etanol.
- Los tubos con la pastilla de ADN, se dejó secar por 15 min de forma invertida sobre papel absorbente.
- Para la hidratación del ADN se agregó 50 µL de TE (10 mM de Tris-Hcl y 1 mM EDTA)
- Se incubó por 1 h en temperatura de 65 °C y finalmente se almacenará a -20 °C hasta su uso.

5.1.3. Amplificación de ADN

A. Selección de cebadores

Los primers o cebadores seleccionados para realizar la identificación del sexo fueron SCAR T1 y SCAR W11 propuestos por Ruiz *et al.* (2017) y Deputy *et al.* (2002), expuestos en el cuadro 5. Los cebadores son capaces de identificar plantas femeninas como hermafroditas, en caso de las plantas masculinas, los cebadores generan el mismo patrón de banda con plantas hermafroditas. Tainung-1 al ser un híbrido comercial produce únicamente plantas femeninas y hermafroditas por su patrón de segregación (Hm x Hm), se considera innecesario el agregar otro par de cebadores capaz de detectar las plantas masculinas.

Cuadro 5. Cebadores o Primers seleccionados tipo SCAR.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Producto	Plantas hembras	Plantas hermafroditas
Par #1 "T1"	Fw 5'-TGCTCTTGATATGCTCTCTG-3' Rv 5'-TACCTTCGCTCACCTCTGCA-3'	1,300 pb	Presente	Presente
Par #2 "W11"	Fw 5'-CTGATGCGTGTGTGGCTCTA-3' Rv 5'-CTGATGCGTGATCATCTACT-3'	800 pb	No presente	Presente

Fuente: en base a Ruiz *et al.* 2017 y Deputy *et al.* 2002.

B. Preparación de cebadores

Los cebadores se encontraban en estado liofilizado, para preparar la solución de los cebadores se realizó los siguientes pasos:

- Se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm para precipitar todo el liofilizado.
- Se verificó la concentración en nanomoles del cebador descrito en inserto y la cantidad de agua libre de nucleasas requerido para preparar la solución a 100 μM . Se agregó el agua y se homogenizó la mezcla mediante vórtex.
- Para preservar la integridad de los cebadores, una vez preparada la solución stock a concentración 100 μM fue necesario realizar una disolución a 10 μM .
- La solución stock 100 μM se almacenan a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se utilizó la disolución a 10 μM , como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Preparación de cebadores en la solución stock a 100 μM y disolución de trabajo a 10 μM .

Cebadores	Concentración en nanomoles	Concentración de la solución Stock	Concentración de la disolución final
SCAR T1 F	24.80 nm	100 μM	10 μM
SCAR T1 R	35.60 nm	100 μM	10 μM
SCAR W11 F	29.30 nm	100 μM	10 μM
SCAR W11 R	22.70 nm	100 μM	10 μM

Fuente: elaboración propia, 2021.

C. Cuantificación de la concentración de ADN

La cuantificación de la concentración de ADN se realizó en un espectrofotómetro Biophotometer Eppendorf®, considerando los siguientes pasos:

- Se programó el Biophotometer Eppendorf® para el análisis de ADN en cadena simple (ssADN)
- Se programó el volumen de ADN y solvente a cuantificar, 4 µL de ADN de las muestras vegetales y 196 µL de medio TE (10 mM de Tris-Hcl y 1 mM EDTA).
- Se colocó en el Biophotometer Eppendorf® una muestra en blanco con un volumen de 200 µL de TE en una cubeta de cuarzo, como solvente base para la medición de la concentración, se programó como blank.
- Se inició con la cuantificación de la concentración de las muestras, se llenaron las cubetas de cuarzo con 4 µL de ADN de las muestras a analizar y 196 µL de TE, se colocó una sección de 2 cm x 2 cm de papel cera en la parte superior de la cubeta y se realizó mezcla por inversión.
- Las muestras mezcladas se colocaron dentro del Biophotometer Eppendorf® obteniendo resultados de concentración en ng/µL y pureza del ADN en la relación 260/280.

D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los reactivos necesarios para realizar la PCR múltiple se describen en el cuadro 7.

Cuadro 7. Reactivos necesarios para realizar una PCR múltiple a un volumen final de 25 µL.

Reactivo	Solución stock	Concentración final
**GoTaq® Green Master Mix	2 X	2 X
ADN	285 ng/µL	100 ng/µl
SCAR T1 (F)	100 µM	10 µM
SCAR T1 (R)	100 µM	10 µM
SCAR W11 (F)	100 µM	10 µM
SCAR W11 (R)	100 µM	10 µM
H ₂ O		Aforar

**GoTaq® Green Master Mix 2X contiene: ADN polimerasa, buffer de reacción (p^H 8.50), dATP, dGTP, dCTP, dTTP en concentración de 400 µM y MgCl₂ 3 mM.

Fuente: elaborado en base a Promega, 2020.

Las muestras fueron amplificadas en un termociclador BioRad PTC-200®, con las siguientes condiciones:

- Una desnaturalización inicial a una temperatura de 95 °C durante 5 min.

Seguido de 30 ciclos:

- A 95 °C durante 30 s.
- Bajar la temperatura a 60 °C por 30 s.
- Subir nuevamente la temperatura a 72 °C por 90 s.

La extensión final

- A 72 °C por 10 min.

E. Electroforesis

a. Preparación de 100 ml de gel de agarosa 1 % p/v

- Se utilizó un erlenmeyer de 250 ml para preparar el gel diluido.
- Se agregó 1 g de agarosa.
- Se añadió 20 ml de disolución tampón TBE 5X (Tris-Borato-EDTA) y se afora a 100 ml.
- La mezcla se calentó en un horno de microondas, en intervalos de 30 s a 60 s, se retira el erlenmeyer y se agitó la mezcla para homogenizar.
- Dejar que la agarosa se enfríe a temperatura ambiente.
- Se preparó el molde de gel, cubriendo los bordes para evitar derrames y se colocó el peine en el molde de gel para formar los pocillos de carga.
- Se vertió la agarosa fundida en el molde de gel.
- Esperar hasta que la agarosa se solidifique por completo, se retiró el peine y se colocó el molde de carga dentro de la cámara de electroforesis. El gel de agarosa debe estar orientado de carga negativa a carga positiva.

b. Transporte del ADN

- Se añadió la disolución tampón TBE 0.50X en la cámara de electroforesis (amortiguador) hasta cubrir la superficie del gel.
- Se agregó 2 μ L del marcador de peso molecular (marcador del tamaño de ADN en pares de bases) en el primer y último pocillo.
- Se agregó el producto amplificado del PCR, realizando una mezcla de 2 μ L de buffer de carga más 2 μ L del producto amplificado (ADN).
- Una vez cargados todos los pocillos de carga, se coloca la tapa de la cámara de electroforesis.
- Se conectó la cámara de electroforesis, cátodo (cable de color negro) y el ánodo (cable de color rojo).
- Una vez comprobado que estaba conectado correctamente, se encendió la cámara de electroforesis y se graduó a corriente constante de 80 voltios.
- Se dejó migrar las muestras durante 1 h.

c. Revelación de bandas

- Se desconectó y se retiró la tapa de la cámara de electroforesis.
- Se retiró el gel del molde y se escurrió el exceso de la disolución tampón (TBE 0.50X) de la superficie del gel.
- Se tiñó el gel en bromuro de etidio (0.10 μ g/ml) durante 15 min.
- Para visualizar las bandas se empleó un trasiluminador de luz ultravioleta (UV), se colocó el gel sobre el trasiluminador y se expuso a la luz UV.
- Se observaron las bandas de ADN de un color naranja fluorescente. Las bandas fueron comparadas con el marcador de peso molecular para determinar el tamaño indicado.

5.2. Identificación del sexo de plantas de papaya del híbrido Tainung-1 mediante el marcador basado en la morfología de la flor, 90 a 120 días después de la germinación

5.2.1. Fase de campo: manejo agronómico (día 32 al 120 después de la germinación)

A. Preparación del suelo

- La preparación del suelo se realizó el 17 de noviembre de 2020, 15 días antes del trasplante, con el fin de que el suelo se encuentre suelto, mullido, libre de plantas arvenses.
- Se realizó el paso de arado con el fin de romper el suelo en una profundidad de 0.40 m y el paso rastra a una profundidad de 0.30 m con el fin de desmenuzar los terrones que se desencadenan del paso del arado.
- Se realizó camas o surcos con la finalidad de evitar anegamientos cercanos a las plantas, además de mejorar la aireación y retención de humedad en el suelo.

B. Trasplante

- Luego de la etapa de vivero (32 días después de la germinación), se realizó el trasplante el día 03 de diciembre de 2020, las plántulas poseían un tamaño aproximado de 0.15 m a 0.30 m de altura.
- El proceso se inició con la apertura de hoyos con distanciamientos de 2 m entre plantas y 2.50 m entre surcos, se trasplantó considerando que las plantas deben de quedar levemente por encima del nivel del suelo, así al momento de compactar (por diversos factores como: lluvia, riego, pisoteo), la plántula no se desnivele y facilite el encharcamiento.
- Al momento de la siembra, se utilizó 2 lb de materia orgánica más suelo para rellenar los hoyos realizados.
- Después del trasplante se realizó la desinfección del suelo utilizando fosetyl+propamocarb.

C. Fertilización

En la fertilización fue considerada hasta los 88 días después del trasplante (120 días después de la germinación), momento de la última recolección de muestras de flores. Se utilizó fertilizantes granulados y foliares. Los fertilizantes granulados fueron aplicados al suelo en la zona de goteo de la planta y los fertilizantes foliares fueron aplicados con un equipo de aspersión de 16 L. En el cuadro 8, se presentan los fertilizantes utilizados.

Cuadro 8. Programa de fertilización ocupado en la evaluación.

No.	Días después del trasplante	Fertilizante	Composición
1	3	Raizal	9-45-11
2	11	Raizal	9-45-11
3	20	Sulfato de amonio	21-0-0 + 24 S
4	27	Triple 20	20-20-20
5	35	Urea	46-0-0
6	42	Triple 20	20-20-20
7	50	Urea	46-0-0
8	55	CaBo	8 % Ca + 2 % Bo
9	58	Master-Flower	ATP + Aa + EM
10	62	ATP + K	1.50 % N – 5 % K – 30 % ATP
11	65	Triple 15	15-15-15
12	68	CaBo	8 % Ca + 2 % Bo
13	71	Master-Flower	ATP + Aa + EM
14	75	ATP + K	1.50 % N – 5 % K – 30 % ATP
15	80	Nitrato de Calcio	15.50-0-0 + 19 Ca
16	83	Master-Flower	ATP + Aa + EM
17	86	ATP + K	1.50 % N – 5 % K – 30 % ATP
18	88	Triple 15	15-15-15

ATP: adenosín trifosfato, EM: elementos menores, Aa: aminoácidos.

Fuente: elaboración propia, 2021.

D. Monitoreo de plagas y enfermedades

Se estableció un sistema de monitoreo semanal de las principales plagas y enfermedades, que consistía en:

- Realizar un recorrido por la parcela.
- Observar el haz y envés de las hojas de las plantas en evaluación.
- En caso de encontrar algún daño, síntoma o signo, se procedió a identificar la plaga o enfermedad que lo cause.
- Se realizó un control químico.
- Por último, se verificó el cumplimiento en cuanto al control.

5.2.2. Identificación del sexo por morfología de la flor

A los 90 a 120 días después de la germinación, al momento de la apertura floral (Del 1 de febrero al 1 de marzo de 2021).

- Se recolectó de 2 a 3 flores (abiertas) por cada una de las 60 plantas en estudio con el código que se les asignó desde la fase de vivero y con el cual se identificaron las muestras para la identificación del sexo por marcadores moleculares.
- Las flores se colocaron en bolsas herméticas.
- Fueron trasladadas al laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía debidamente refrigeradas, en donde, se observó la morfología floral para la identificación del tipo sexual de la planta.
- El tiempo transcurrido desde la toma de muestras florales hasta la identificación morfológica en el laboratorio fue menor a 24 h.

5.3. Determinación del porcentaje de predicción entre el marcador molecular tipo SCAR y el marcador morfológico

En base a los resultados obtenidos en la identificación del sexo de las plantas mediante el uso de marcadores moleculares y los resultados de la identificación del sexo mediante el marcador morfológico.

- Se procedió a realizar la comparación del sexo de cada planta analizada por ambos métodos.
- Se realizó un conteo del número de plantas femeninas y hermafroditas que coinciden en ambos métodos.
- Se determinó el porcentaje de predicción de sexo del método de identificación mediante el marcador molecular con respecto a la identificación mediante al marcador morfológico.
- Se realizó un análisis estadístico de chi-cuadrado con la finalidad de determinar si los métodos se ajustan significativamente entre sí.
- Se interpretaron los resultados.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación del sexo de plantas del híbrido Tainung-1 mediante el marcador molecular SCAR, 20 días después de su germinación

6.1.1. Material vegetal y vivero

La semilla que se utilizó en la evaluación es certificada, importada de Taiwán y tratada en Estados Unidos (Negocios del tropico, 2020), se realizó la siembra de 210 semillas en bandejas de germinación utilizando peat-moss como sustrato, bajo un sarán de 70 % de sombra, obteniendo 198 plántulas, siendo un 94.28 % de germinación y emergencia, estos datos son similares a los expuestos por el proveedor (germinación y emergencia mayor o igual a 95 %).

La fase de vivero se dividió en dos etapas, una inicial, que se efectuó en las bandejas de germinación donde las semillas germinaron y emergieron en un rango de 4 a 10 días posterior al proceso de pregerminación, se brindó un tiempo de desarrollo de 8 días después de la germinación. La fase final de vivero, consiste en el trasplante de las bandejas de germinación a bolsas de polietileno 6 inch x 9 inch utilizando suelo, materia orgánica y arena en relación 1:1:1 como sustrato, se brindó un total de 24 días de desarrollo en esta fase (total 32 días después de la germinación).

En la toma de muestras en fase de vivero a los 20 días después de la germinación se implementó un sistema de codificación que consistió en una letra y un número de forma correlativa, se seleccionó 60 plantas de manera aleatoria y se dividió en 4 grupos de igual cantidad de plantas, al grupo 1 se le asignó la letra A y un número correlativo del 1 al 15, al grupo 2 se le asignó la letra B y un número correlativo del 1 al 15, de esta manera se realizó para el resto de grupo (C y D), la codificación se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Código asignado a 60 plantas utilizadas en la identificación de sexo mediante marcador molecular y marcador morfológico.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Código	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
No.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Código	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Código	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
No.	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Código	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15

6.1.2. Extracción de ADN

El ADN se aisló a partir de hojas de las 62 muestras vegetales, siguiendo el protocolo ya descrito con anterioridad, 60 muestras de sexo desconocido tomadas en fase de vivero y 2 muestras tomadas de plantas en floración de sexo definido (femenina y hermafrodita).

La calidad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1.50 %, teñidos con bromuro de etidio a 0.10 ug/ml y visualizado en luz UV. El resultado se observa en la figura 8.

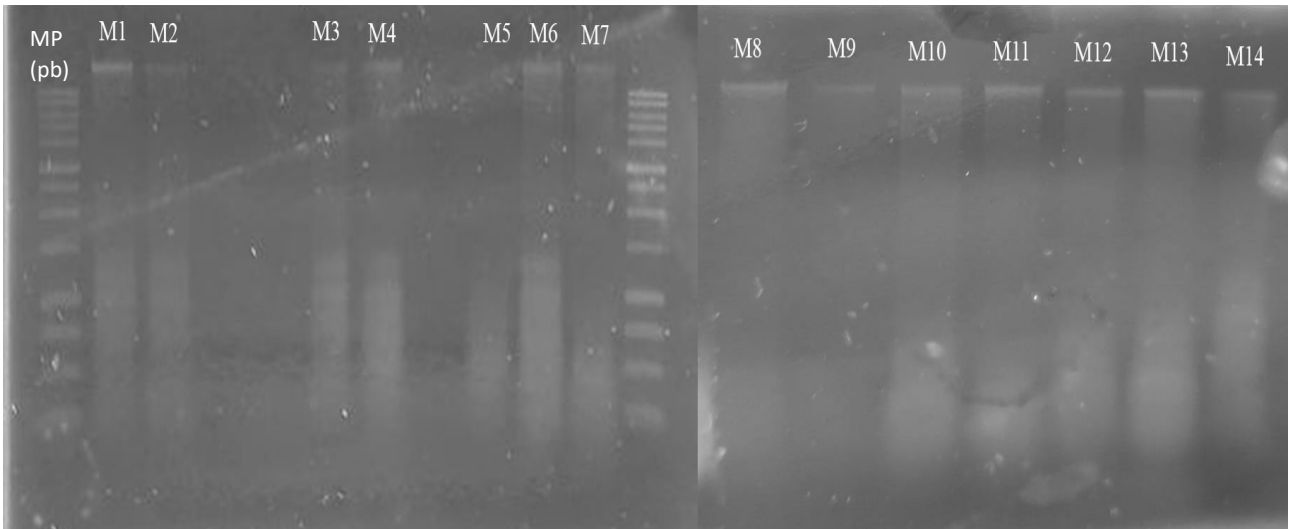


Figura 8. Electroforesis de evaluación de la calidad de ADN.

Se visualizó el marcador de peso molecular y bandas definidas en 12 de 14 (< 85 %) de las muestras de ADN (M1-M14), además, visualizó una posible contaminación por proteínas expresado en un barrido por debajo de las bandas. Por lo que, se procedió a verificar la pureza y concentración de ADN por cuantificación a partir de un biofotómetro eppendorf®.

La concentración ADN de las muestras vegetales se calculó en base a la absorbancia obtenida en una longitud de onda de 260 nm y la pureza se calculó a partir de la relación de absorbancias A260/280 de las muestras. Las concentraciones de ADN obtenidas de las muestras se encontraron dentro del rango de 244 ng/μl a 355 ng/μl, con un promedio de 285 ng/μl. La relación A260/280 promedio para las muestras analizadas fue de 1.63.

Según lo descrito por el banco de ADN en (2020), considera una pureza aceptable para evaluación las muestras dentro del rango de 1.60 a 1.70, sin embargo, recomienda en una pureza optima de 1.80 a 2.10, y no recomienda las muestras por debajo de 1.60 que es considerado como, ADN contaminado por compuestos aromáticos y por encima de 2.10 que considera como, ADN contaminado con ARN. La concentración de ADN se disminuyó a 100 ng/μl para su amplificación de acuerdo a las indicaciones establecidas por Promega para el uso de GoTaq® Green Master Mix (< 250 ng/μl). (Promega 2020).

6.1.3. Amplificación de ADN

Para evaluar el desempeño de los marcadores moleculares tipo SCAR en la identificación de sexo, se procedió a verificar los cebadores de manera individual y en conjunto, se realizaron 3 reacciones diferentes, primera PCR con pares de cebadores SCAR T1, segunda PCR con pares de cebadores SCAR W11 y tercera PCR múltiple utilizando ambos pares de cebadores SCAR T1/W11. Se tomó el ADN extraído de dos muestras vegetales de sexo ya definido en plantación comercial, (muestra de planta femenina y planta hermafrodita), se tomó el ADN de una tercera muestra vegetal de una planta en fase de vivero de sexo desconocido. Los resultados se observan en las figuras 9 y 10.

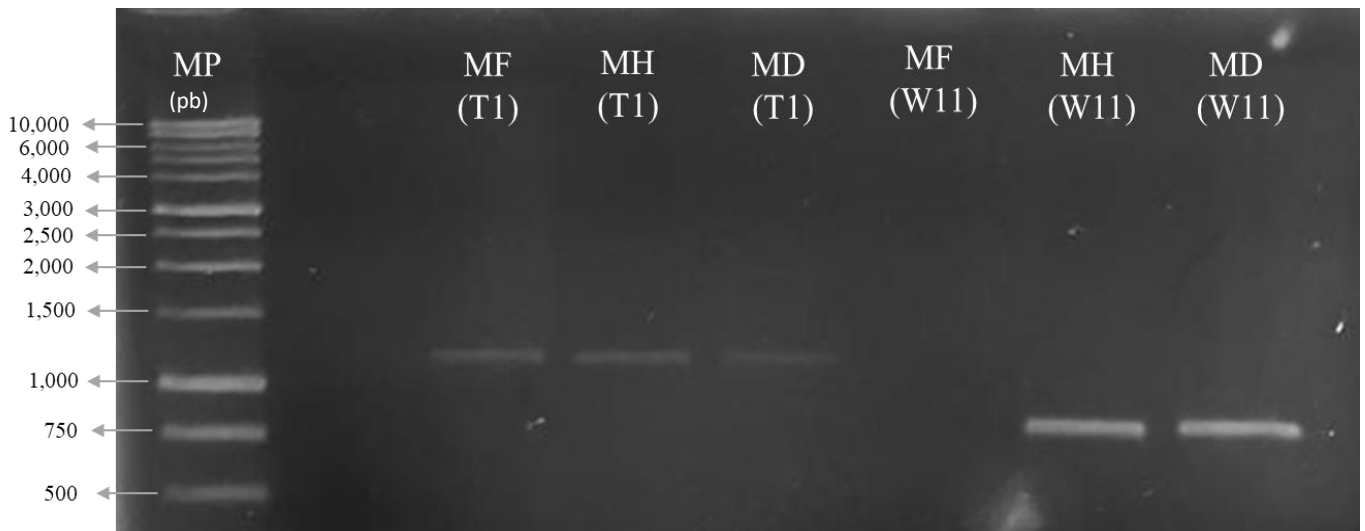


Figura 9. Electroforesis del desempeño en PCR de los cebadores T1 y W11.

En electroforesis en gel de agarosa al 1.50 %, teñido en bromuro de etidio y visualizado en luz UV, se observó, el marcador de peso molecular (MP), un segmento de ADN de 1,300 pb amplificado por PCR para las muestras de plantas femenina (MF), hermafrodita (MH) y desconocida (MD) con los cebadores T1 y un segmento de ADN de 800 pb amplificado por PCR para las muestras de plantas hermafrodita (MH) y desconocida (MD) con los cebadores W11.

Según el desempeño en el PCR con los cebadores T1, se observó únicamente un resultado posible, en plantas femeninas y hermafroditas amplificó un segmento de ADN de 1,300 pb, por lo que, el cebador T1 no presenta una variabilidad que permita diferenciar el sexo de las plantas. El desempeño en el PCR con los cebadores W11, se observó dos resultados posibles, en plantas hermafroditas amplificó un segmento de ADN de 800 pb y en plantas femeninas no amplificó, el cebador W11 presenta variabilidad que permite diferenciar el sexo en las plantas.

Basado en el desempeño se puede utilizar el cebador W11 para identificar el sexo en plantas de papaya (*C. papaya* L.) sin embargo, se puede presentar la desventaja de “falso femeninos”, que consiste en que las muestras vegetales que no amplifiquen un segmento de ADN por factores externos al PCR y sean clasificadas como femeninas, por lo que es recomendable el uso del cebador T1, que en base a su desempeño amplifica un segmento de ADN de 1,300 pb en todas las muestras de plantas independientemente del sexo, este resultado es útil como un control positivo de amplificación para analizar en diferentes genotipos dentro de la especie y en la predicción de sexo generando un polimorfismo (variabilidad) que permita clasificar entre plantas femeninas y hermafroditas.

El desempeño de los cebadores T1/W11 en PCR múltiple se presentan en la figura 10.

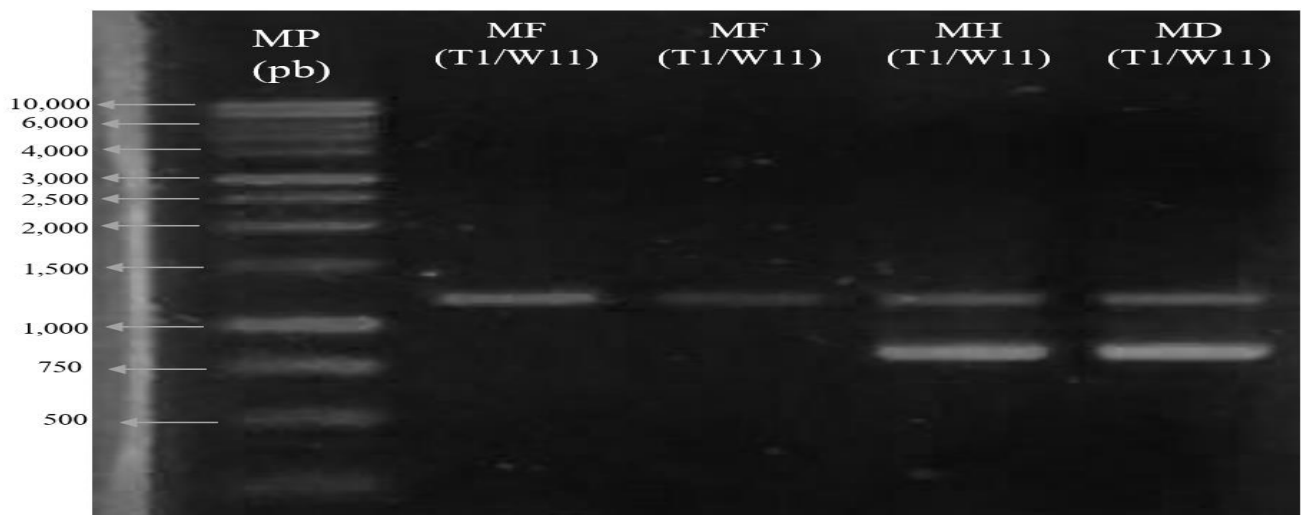


Figura 10. Electroforesis del desempeño en PCR múltiple de los cebadores T1/W11.

En electroforesis en gel de agarosa al 1.50 %, teñido en bromuro de etidio y visualizado en luz UV, se observó, el marcador de peso molecular (MP), un segmento de ADN de 1,300 pb amplificado por PCR para las muestras de plantas femeninas (MF), con los cebadores T1/W11 y dos segmentos de ADN de 1,300 pb y 800 pb amplificado por PCR para las muestras de plantas hermafrodita (MH) y desconocida (MD) con los cebadores T1/W11.

Según el desempeño en PCR múltiple con los cebadores T1/W11, se observó dos posibles resultados, en plantas femeninas amplificó un segmento de ADN de 1,300 pb del cebador T1, en plantas hermafroditas amplificó dos segmentos de ADN, 1,300 pb del cebador T1 y 800 pb del cebador W11. Al observar la muestra vegetal de sexo desconocido, se identifican dos segmentos de ADN por lo que se clasifica como planta hermafrodita.

Basado en el desempeño se puede determinar que el uso de PCR múltiple utilizando los cebadores T1/W11, se puede identificar el sexo de las plantas de papaya de una manera precisa y confiable, al utilizar un par de cebadores como control positivo en la amplificación y un segundo par de cebador que permita generar la variabilidad entre sexos.

El desempeño de los cebadores coincide con los resultados expuestos por Ruiz *et al.* (2017) y Deputy *et al.* (2002), describen que, el par de cebadores SCAR T1 amplificó como control positivo en todas las muestras vegetales analizadas, este par de cebadores se desempeñó de forma similar en PCR individual y múltiple amplificando una banda de 1,300 pb. El par de cebadores SCAR W11 amplificó únicamente en muestras hermafroditas, este par de cebadores se desempeñó de forma similar en PCR individual y múltiple amplificando una banda de 800 pb, al evaluarlo en conjunto en PCR múltiple se generó un polimorfismo que permite distinguir entre plantas femeninas (una banda) y plantas hermafroditas (dos bandas).

Para validar los cebadores, se tomó el ADN aislado de hojas en fase de vivero de 60 muestras vegetales de sexo desconocido y anteriormente codificadas, se procedió amplificar mediante PCR múltiple (cebadores SCAR T1/W11). Los resultados se presentan en la figura 11.

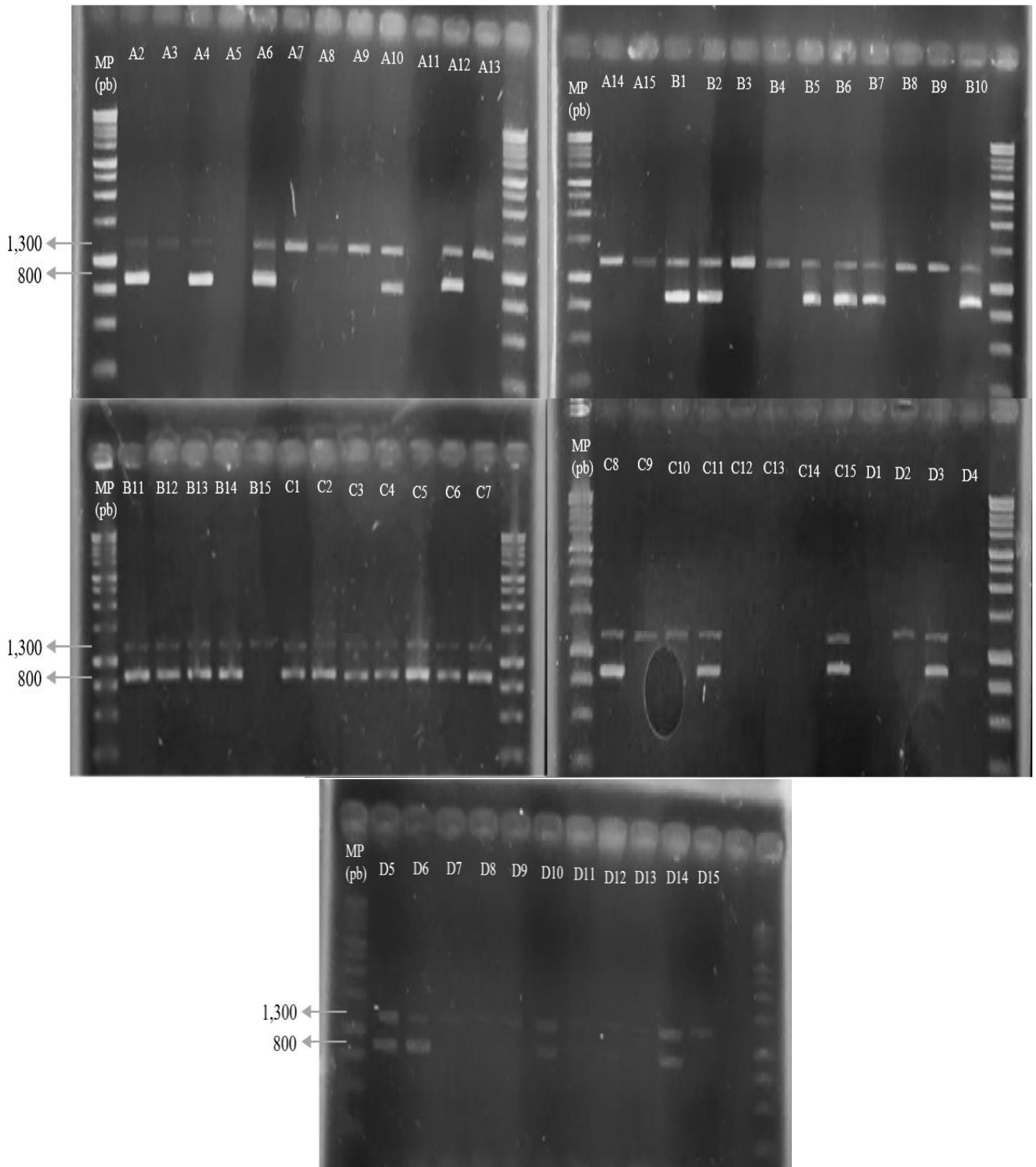


Figura 11. Resultados de 60 muestras de plantas de sexo desconocido tomada en fase de vivero a 20 días después de la germinación.

En las electroforesis realizadas en gel de agarosa al 1.50 %, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en luz UV, se observó, el marcador de peso molecular (MP), segmentos de ADN de 1,300 pb (cebador T1) y segmentos de ADN de 800 pb (cebador W11), las muestras que amplificaron un segmento de ADN de 1,300 pb corresponden a muestras de tipo sexual femeninas y las muestras que amplificaron dos segmentos de ADN, 1,300 pb y 800 pb, corresponden a muestras de tipo sexual hermafroditas. Los resultados de las muestras de plantas identificadas y su código se transcribieron en los cuadros 10 y 11.

Cuadro 10. Resultados de la amplificación molecular de 60 muestras vegetales de sexo desconocido tomadas en fase de vivero 20 días después de la germinación.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Código	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Tipo sexual	Hm	Hm	F	Hm	F	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	F	F
No.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Código	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
Tipo sexual	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Código	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
Tipo sexual	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	F	Hm	Hm
No.	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Código	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15
Tipo sexual	Hm	F	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	Hm	F

Hm: plantas de tipo sexual hermafrodita, F: plantas de tipo sexual femenina

Cuadro 11. Resumen de los resultados en la identificación del sexo mediante marcadores moleculares.

Plantas Totales	Plantas Hm (MM)	Porcentaje (%)	Plantas F (MM)	Porcentaje (%)
60	36	60	24	40

MM: marcador molecular.

En base con los resultados expuestos en los cuadros 10 y 11, se identificó el tipo sexual de 60 plantas, 36 plantas de sexo hermafroditas, correspondiente al 60 %, y 24 plantas de sexo femeninas que corresponde al 40 % del total. Para determinar el porcentaje de predicción del método mediante marcadores moleculares es necesario determinar el número de plantas femeninas y plantas hermafroditas y realizar una comparación de resultados en base a su código.

6.2. Identificación del sexo de plantas de papaya del híbrido Tainung-1 mediante el marcador basado en la morfología de la flor, 90 a 120 días después de su germinación

Se recolectó de dos a tres muestras de flores de 59 plantas (perdida de una unidad experimental), para identificar el tipo sexual basado en la morfología de la flor, 90 a 120 días después de la germinación que coincide con la floración del cultivo. El número de muestras de flores se realizó en base a que, la planta de papaya (*C. papaya* L.), es una especie dioica que son plantas unisexuales, cada planta posee su sexo y expresa flores únicamente de su tipo sexual, por lo tanto, 2 o 3 flores son suficiente para la identificación sexual. (En plantas comerciales, hermafroditas y femeninas). Los resultados de la identificación se muestran en los cuadros 12 y 13.

Cuadro 12. Resultado de la caracterización sexual basado en la morfología de la flor de 59 muestras tomadas en campo de 90 a 120 días después de la germinación.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Código	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Tipo sexual	Hm	Hm	F	Hm	F	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	F	Hm
No.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Código	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
Tipo sexual	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Código	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
Tipo sexual	Hm	Hm	X	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	F	Hm	Hm
No.	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Código	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15
Tipo sexual	Hm	F	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	Hm	F

Hm: plantas de tipo sexual hermafrodita, F: plantas de tipo sexual femenina, x: planta perdida en campo antes de la floración. C3: unidad experimental perdida en campo antes de su floración.

Cuadro 13. Resumen de los resultados en la identificación del sexo mediante marcadores moleculares.

Plantas Totales	Plantas Hm (MF)	Porcentaje (%)	Plantas F (MF)	Porcentaje (%)
60	36	61.02	23	38.98

MF: marcador morfológico.

Se identificó la morfología de cada flor con base a los caracteres florales de cada muestra (observado desde la figura 1 a la figura 5), se determinó, el tipo sexual de 59 plantas, 36 plantas de sexo hermafrodita que corresponde al 61.02 % y 23 plantas de sexo femenina correspondiente al 38.98 % del total.

La presencia de plantas hermafrodita y femeninas posee una proporción 2:1, en ambos métodos de identificación sexual (marcadores moleculares y morfológicos), de acuerdo con el patrón de segregación esperado según el híbrido utilizado (Tainung-1), además, los resultados se asemejan con lo mencionado por Alonso *et al.* (2009), que obtuvo 68.20 % y

65.30 % de plantas hermafroditas; 31.80 % y 34.70 % de plantas femeninas respectivamente en las dos evaluaciones realizadas en Tainung-1 en los años 2006 y 2007.

Teniendo en cuenta los resultados de la identificación sexual con base a los caracteres morfológicos de las flores se procede a realizar una comparación con los resultados de la identificación sexual mediante marcadores moleculares con la finalidad de determinar la predicción del método del marcador molecular.

6.3.Determinación del porcentaje de predicción entre el marcador molecular tipo SCAR y el marcador morfológico

Según los datos obtenidos en la identificación del sexo mediante el marcador molecular tipo SCAR y la identificación del sexo mediante el marcador morfológico, se realizó la comparación de los resultados de 59 muestras vegetales (se eliminó C3, debido a la pérdida de la unidad experimental en campo antes de la floración). Para la comparación de los resultados se consideró el código de cada planta identificada y el tipo sexual determinado según el método, los resultados se muestran en los cuadros 14 y 15.

Cuadro 14. Comparación de resultados entre la identificación de sexo mediante el marcador molecular tipo SCAR y marcador morfológico.

No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Código		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Tipo sexual	MM	Hm	Hm	F	Hm	F	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	F	F
	MF	Hm	Hm	F	Hm	F	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	F	Hm
No.		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Código		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
Tipo sexual	MM	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F
	MF	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F
No.		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Código		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
Tipo sexual	MM	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	F	Hm	Hm
	MF	Hm	Hm	X*	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	Hm	Hm	F	Hm	Hm
No.		46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Código		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15
Tipo sexual	MM	Hm	F	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	Hm	F
	MF	Hm	F	Hm	Hm	Hm	Hm	F	F	F	Hm	F	Hm	F	Hm	F

Plantas Hm: plantas hermafroditas, Plantas F: plantas femeninas. MM: marcadores moleculares y MF: marcadores morfológicos. *se eliminó C3, debido a la pérdida de la unidad experimental en campo antes de la floración

Cuadro 15. Resumen de resultados de la identificación de sexo mediante marcador molecular tipo SCAR y marcador morfológico y porcentaje de predicción.

Plantas Totales	Plantas Hm (MM)	Plantas Hm (MF)	Plantas F (MM)	Plantas F (MF)	Predicción
59	35	36	24	23	98.30 %

Plantas Hm: plantas hermafroditas, Plantas F: plantas femeninas. MM: marcadores moleculares y MF: marcadores morfológicos.

Con base a los cuadros 14 y 15, se determinó una predicción del tipo sexual del 98.30 % del material vegetal, al coincidir 58 de 59 plantas muestreadas. La planta que no presentó coincidencia corresponde al código A15, en la identificación mediante marcadores moleculares tipo SCAR se expresó de sexo femenino amplificando únicamente una banda de 1,300 pb y en la identificación mediante morfología floral se expresó de sexo hermafrodita generando flores con cinco pares de anteras y un ovario.

La predicción de 98.30 %, son similares a los reportados por Deputy et al. (2002), que indica, la técnica de sexado utilizando los marcadores moleculares tipo SCAR predijo correctamente el 99.20 % de las plantas hermafroditas en una población de plantas de las variedades hawaianas y Ruiz et al. (2017), determinó que el uso de estos marcadores moleculares representa una confiabilidad del 100 % en la predicción temprana del sexo en plantas hermafroditas en la variedad maradol.

Los resultados expuestos indican que es posible identificar con precisión el sexo de las plantas en papaya, utilizando una técnica basada en PCR que requiere solo una muestra mínima de tejido vegetal tomada en plántula. La detección del cromosoma masculino o hermafrodita se puede lograr utilizando los cebadores SCAR W11 en un PCR múltiple con SCAR T1, el cebador W11, identifica las plantas hermafroditas o masculinas generando un producto de 1,300 pb, sin embargo, 1 de 36 plantas hermafroditas no generó un producto en la amplificación (planta A15).

En el método del marcado molecular, se espera que el número de plantas mal identificadas no sea significativo, aun así, se debe tener cierta precaución en campo. La alta precisión del método de identificación sexual mediante marcadores moleculares se debe a la posición flanqueada por los cebadores tipo SCAR dentro de los genes sexuales, este método se espera que en la mayoría de los casos posea una predicción cercana al 100 %. (Deputy et al. 2002)

Los cebadores T1 y W11 son mapeados a 7 cM y a 0.30 cM flanqueados en el gen Sex1, los cebadores W11 no muestran recombinación en plantas individuales a comparación del cebador T1 lo que indica que está ligado al gen. Los cebadores de 20 pb para SCAR W11 incluyen 10 pb del cebador RAPD (secuencia original del cual fue derivado) y 10 pb deducidas de la secuenciación del fragmento RAPD. Las plantas mal clasificadas, se

explican por la mutación puntual (una o varias) en el sitio del cebador de las 10 pb originales desencadenadas por los progenitores.

La alta precisión expuesta por Deputy et al. (2002), al evaluar 750 plantas, 744 eran plantas hermafroditas y 6 plantas femeninas con una tasa de predicción exitosa para hermafroditas del 99.20 %, son demostrados al evaluar 59 plantas, 35 plantas hermafroditas y 24 plantas femeninas con un predicción 98.30 %, que coincide con la identificación sexual de 58 de 59 plantas, situación en la que esta tecnología podría usarse para identificar el sexo de la planta de papaya, sin embargo, la predicción del método molecular debe ser evaluado bajo un análisis estadístico.

6.3.1. Análisis estadístico

En base a los resultados obtenidos en el cuadro 15, se efectuó un análisis estadístico de chi-cuadrado (χ^2), con el fin de determinar si existe una diferencia significativa entre la frecuencia de los marcadores moleculares y la frecuencia del marcador morfológico, presentados en el cuadro 16. Se planteó dos posibles hipótesis.

- Hipótesis nula (H_0): la frecuencia del marcador molecular se ajusta estadísticamente a la frecuencia del marcador morfológico.
- Hipótesis alternativa (H_a): la frecuencia del marcador molecular no se ajusta estadísticamente a la frecuencia del marcador morfológico.

Cuadro 16. Análisis estadístico de Chi-cuadrado.

Tipo sexual	Método		χ^2
	MM	MF	
Plantas Hm	35	36	0.02778
Plantas F	24	23	0.04348
	Total		0.07126

Plantas Hm: plantas hermafroditas, Plantas F: plantas femeninas. MM: marcadores moleculares y MF: marcadores morfológicos.

El nivel de confianza considerado es de 99 % y grado de significancia del 0.01, por lo que el valor crítico de $X^2_{(0.01,1)} = 6.63$ (según la tabla de distribución de valores críticos de X_i^2 con 1 grado de libertad, mostrada en la figura 26A).

El valor calculado de X_i^2 : 0.07126 se compara con el valor crítico de la tabla de distribución de X_i^2 : 6.63. Siendo el valor calculado menor que el valor crítico, además, de ser un valor cercano a 0 que muestra una concordancia de los datos cercana al 100 %, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula planteada y se concluye que, la frecuencia del marcador molecular se ajusta significativamente a la frecuencia del marcador morfológica con un 99 % de confiabilidad y un 0.01 de significancia.

Esto demuestra que lo mencionado por Deputy et al. (2002), que el método de identificación sexual mediante marcadores moleculares es confiable, con alta precisión y que el número de plantas mal identificadas no serán significativas, por lo que es factible y viable en la identificación temprana del sexo en plantas de papaya (*C. papaya* L.).

6.3.2. Interpretación de segmentos amplificadas

Los resultados obtenidos a partir del uso de los cebadores SCAR T1 y W11 en PCR múltiple, permitieron identificar de manera temprana el sexo entre plantas hermafroditas y plantas femeninas, desde el punto de vista de plantaciones comerciales el uso de marcadores se considera confiable, viable y útil para el propósito. Sin embargo, en estudios de mejoramiento genético en variedades silvestres donde se necesite la diferenciación sexual entre plantas masculinas y hermafroditas, el uso del cebador SCAR W11 posee la desventaja de no poseer una variabilidad entre estas plantas.

Esto se debe a que el cebador SCAR W11 ha sido ubicado en el cromosoma Y, ligado al locus Sex1, (Deputy et al., 2002), las plantas masculinas y hermafroditas llevan un cromosoma Y, donde se ubica el locus de determinación sexual Sex1 (Liu et al. 2004) y el producto amplificado es igual en los dos tipos sexuales (1,300 pb).

El sexo en las plantas de papaya está controlado genéticamente por una región ligada al sexo que se comporta como un cromosoma sexual XY, en plantas hermafroditas y

masculinas están controladas por regiones del cromosoma Y ligeramente diferentes, la región hermafrodita específica de Y^h (HSY) y la región masculina específica de Y (MSY), (Liao, Yu y Ming, 2017).

Las combinaciones de Y e Y^h (YY, YY^h e Y^hY^h) son inviables y los embriones son abortados luego de la polinización, esto se debe a la similitud entre los cromosomas Y y la falta del gen funcional presente en el cromosoma X. Van-Buren *et al* (2015), determinó las diferencias entre las secuencias HSY y MSY, a través de la secuenciación de la región específica masculina (RMS) en papaya, el proceso consistió en secuenciar y alinear las regiones HSY y MSY, donde estimó que su divergencia de nucleótidos era del 0.40 %, con 32,517 diferencias de secuencias en total. La identidad de las secuencias es de 99.60 % entre las regiones específicas (HSY y MSY), esto explica el por qué el cebador SCAR W11 amplifica en plantas masculinas y plantas hermafroditas sin variabilidad, ya que flanquea una porción de ADN idéntica dentro de la región específica.

6.3.3. Análisis de eficiencia del material vegetal en uso comercial

La siembra del cultivo de papaya en Guatemala, se realiza convencionalmente por semillas, realizando una fase de vivero y posteriormente un trasplante a campo definitivo, el número de plantas en campo puede variar dependiendo los distanciamientos de trasplante, para la región del departamento de Petén suelen utilizar distanciamiento desde 2 m hasta 3 m entre plantas y entre surcos, esto desencadena densidades en campo desde 1,100 plantas hasta 2,500 plantas comerciales por ha (las densidades pueden variar según condiciones ambientales y edáficas).

Para el híbrido Tainung-1 que posee un patrón de segregación 2:1 de plantas hermafroditas y plantas femeninas respectivamente, al momento del trasplante de vivero a campo, en cada punto de siembra se coloca 3 plantas en tresbolillo (formando un triángulo equilátero) a 0.30 m de distancia entre plantas, y así asegurar que, 1 de las 3 plantas es de valor comercial (planta hermafrodita), al momento del sexado (2 ó 3 meses después del trasplante) se realiza el raleo de plantas eliminando 2 de las 3 plantas en el punto (en el sexado se prioriza

una planta hermafrodita y se eliminan dos plantas sean femeninas o hermafroditas). (Esquivel, 2010)

El sistema de sexado convencional, basado en la morfología de la flor, elimina $2/3$ (66 %) de plantas llevadas a campo, por lo que, en la planificación de siembra se debe de considerar, la densidad de plantas en campo ($1/3$ ó el 33 %) más las plantas que serán raleadas al momento del sexado ($2/3$ ó el 66 %). El sistema de identificación sexual mediante el uso de marcadores moleculares tipo SCAR, puede evitar llevar a campo plantas sin valor comercial (plantas femeninas), siendo capaz de identificar plantas hermafroditas en fase de vivero (15 a 30 días), logrando llevar a campo un porcentaje de plantas con valor comercial cercano al 100 %, y reduciendo la pérdida de plantas a un valor cercano al 0 %, evitando así las pérdidas de recurso vegetal por la eliminación de $2/3$ del total de plantas en comparación al sistema convencional de sexado.

7. CONCLUSIONES

1. De 59 muestras vegetales (hojas) correspondientes a plantas comerciales de sexo desconocido de 20 días después de la germinación y analizadas con los marcadores moleculares tipo SCAR (cebadores T1 y W11), se identificó 35 plantas hermafroditas (presencia de doble banda 1,300 pb y 800 pb) y 24 plantas femeninas (presencia de una banda 1,300 pb).
2. De 59 muestras vegetales (flores abiertas) correspondientes a plantas comerciales de sexo definido según su floración, de 90 a 120 días después de la germinación y basada en la morfología de la flor, se identificó 36 plantas hermafroditas y 23 plantas femeninas. Las plantas comerciales de Tainung-1 concuerdan con la proporción 2:1 en plantas hermafroditas y femeninas de acuerdo al patrón de segregación esperado.
3. Al comparar los resultados obtenidos a partir de la identificación del tipo sexual basado en el uso de los marcadores moleculares SCAR (20 días) y en la identificación del tipo sexual basado en el marcador morfológico de la flor (90 días a 120 días), se determinó que el porcentaje de predicción del marcador molecular es de 98.30 % al coincidir el tipo sexual de 58 de 59 plantas en el cultivo de papaya. Por lo tanto, los marcadores moleculares tipo SCAR (cebadores T1/W11), se comportan de manera confiable y precisa en la detección temprana del sexo de plantas hermafroditas y plantas femeninas por lo que puede ser utilizado para un uso más eficiente de plantas en la identificación de sexo en el cultivo de papaya híbrido Tainung-1.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de marcadores moleculares en la identificación temprana de sexo en plantas de papaya (*C. papaya* L.), el método de identificación molecular ayuda al uso eficiente de plantas con valor comercial, reduciendo aproximadamente un 50 % de plantas eliminadas en campo al momento de la identificación sexual por el método convencional.

9. BIBLIOGRAFIA

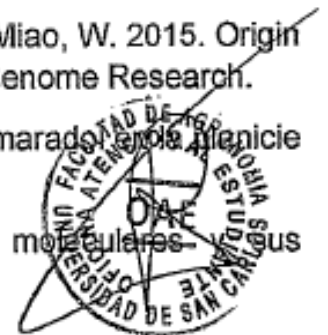
1. Alonso, M; Torret, Y; Ramos, R; Farrés, E; Rodríguez, D. 2009. Evaluación de dos híbridos de papaya "Tainung-1" & "Scarlett Princess" introducidos en Cuba. Cuba-Costa Rica. Agronomía Costarricense.
2. Aranda, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Ing. Francisco Morazan, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
3. Austin, C. 2020. Electroforesis. Estados Unidos, National Human Genome Research Institute.
4. Banco Nacional de ADN. 2020. Programa de control de calidad de muestras de ácidos nucleicos: Banco Nacional de ADN Carlos III. Salamanca, España, Universidad de Salamanca.
5. Barreno, A; Marroquin, C. 2012. Caracterización económica de la producción comercial del cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en el departamento de Peten, Guatemala. Tesis Ing. Francisco Morazan, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
6. Climate-data.org. 10 oct. 2020. Resumen Climático de Asunción Mita, Jutiapa: Tabla Climática de Datos históricos del Tiempo en Asunción Mita (en línea). Jutiapa, Guatemala. Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <https://en.climate-data.org/north-america/guatemala/jutiapa/asuncion-mita-53764/#climate-graph>.
7. Collins, F. 2020. Polimorfismo. Estados Unidos, National Human Genome Research Institute.
8. CONABIO (Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad), Mexico. 2009. Catálogo Taxonómico de Especies de México. Ciudad de México, México, Capital Nat. Conabio Mex.
9. Deputy, JC; Ming, R; Ma, H; Liu, Z; Fitch, MM; Manshardt, R; Stiles, JI. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). United States, University of Hawaii, Theor Appl Genet.
10. Esquivel Sandoval, VE. 2010. Trabajo de graduación realizado en cultivo de papaya, bajo condiciones de la finca misión técnica agrícola china – Taiwán en el municipio de la libertad, Petén. Tesis Ing. Petén, Guatemala, Facultad de agronomía, USAC.
11. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2018. Estadísticas del cultivo de papaya. Italia, FAO.
12. Franco, JL. 2020. Marcador Genético. Estados Unidos, Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano.



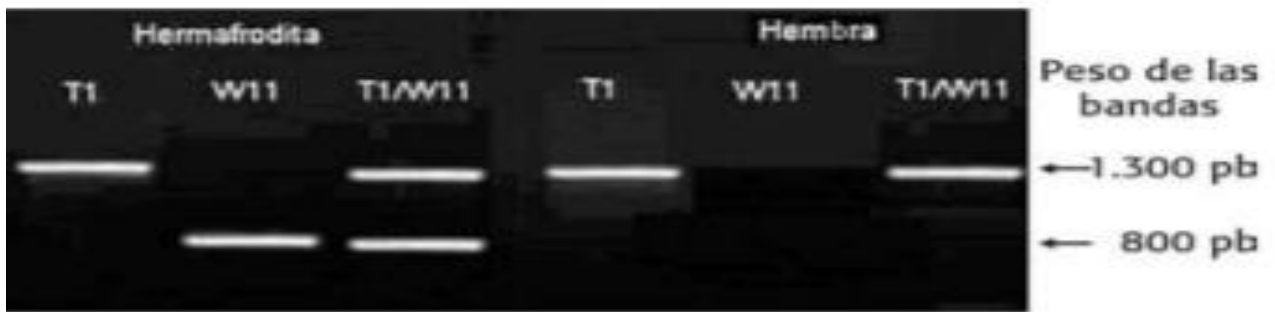
13. García, MA. 2010. Guía Técnica del Cultivo de la Papaya. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova". San Salvador, El Salvador, Ministerio de Agricultura (MAG).
14. Gil, AI; Miranda, D. 2005. Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia, Agronomía Colombiana.
15. INE (Instituto Nacional de Estadística, Guatemala). 2013. Caracterización departamental Jutiapa. Jutiapa, Guatemala, INE.
16. Jiménez, J. 2002. Manual práctico para el cultivo de papaya hawaiana. Guácimo, Costa Rica, EARTH.
17. Köppen, W. 1918. Clasificación de climas según temperatura, precipitación y ciclo estacional. Alemania, Petermanns Geogr. Mitt.
18. Liao, Z; Yu, Q; Ming, R. 2017. Development of male-specific markers and identification of sex reversal mutants in papaya. United States, Springer Science+Business Media Dordrecht.
19. Liu, Z; Moore, P; Ma, H; Ackerman, C; Ragiba, M; Yu, Q. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. London, United Kingdom, Nature Publishing Group.
20. MAGA (Ministerio de agricultura, ganadería y alimentación, Guatemala). 2017. Ficha de Mercado de Papaya Tainung-1. Ciudad de Guatemala, Guatemala, MAGA.
21. Malo, S; Campbell, C. 1994. The papaya. Florida, Estados Unidos, Universidad de Florida.
22. Megía, R. 1 abr. 2020. PCR: Definición y Aplicaciones (en línea). Consultado 1 abr. 2020. Disponible en <https://genotipia.com/pcr/>.
23. Ming, R; Moore, P. 2014. Genetics and genomics of papaya. United States, Springer Science & Business Media.
24. NIH (National Human Genome Research Institute, United States). 2019. Reacción en Cadena de la Polimerasa. United States, NIH.
25. Nuez, F; Carrillo, JM. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia.
26. Palacios, L; Acevedo, S; López, H; Hernández, A; Padilla, A. 2013. Diagnóstico socioeconómico, potencialidades productivas y propuestas de inversión en la zona Mita. Jutiapa, Guatemala, Facultad de Ciencias Económicas, USAC.
27. Picca, A; Huelguera, M; Carrera, A. 2004. Marcadores Moleculares Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argentina, Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología, INTA.



28. Promega. 2020. GoTaq® Green Master Mix. United States, Promega Corporation.
29. Ruano-Roca, JA. 2019. efecto de tres niveles de calcio en la producción de papaya (*Carica papaya* L.), diagnóstico y servicios realizados para empresa yara guatemala y fincas de anisa, Las Cruces, Petén, Guatemala, C.A. Tesis Ing. Petén, Guatemala, Facultad de Agronomía, USAC.
30. Ruiz, F; Cruz, J; Anaya, J; Rodriguez, A. 2017. Evaluación de marcadores moleculares en la predicción temprana de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) de tipo hermafrodita var. maradol en la zona Costa de Oaxaca. Oaxaca, México, Universidad del Mar Campus Puerto Escondido, INIFAP.
31. Sánchez-Betancourt, E; Nuñez-Zarantes, V. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L). Colombia, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
32. Sarmiento, H. (09 jun. 2017). Agexport: EEUU aumenta el consumo de papaya fresca de Guatemala (en línea). Consultado 1 abr. 2020. Disponible en <https://agexporthoy.export.com.gt/sectores-de-exportacion/sector-agricola/ee-uu-aumenta-consumo-papaya-fresca-guatemala/>.
33. SEGEPLAN (Secretaría de planificación y programación de la presidencia, Guatemala). 2020. Demografía de Asunción Mita, Jutiapa. Jutiapa, Guatemala, INE-SEGEPLAN.
34. SIECA (Secretaría de Integración Económica Centroamericana, Guatemala). 2014. Perfil Comercial Papaya. Ciudad de Guatemala, Guatemala, MAGA.
35. SIMSAN (Sistemas de Información Municipales en Seguridad Alimentaria y Nutricional, Guatemala). 10 oct. 2020. Sistema de Clasificación Municipal en Seguridad Alimentaria y Nutricional: Nuestro ambiente (en línea). Consultado 10 oct. 2020. Disponible en <http://www.trinacional.simsan.org/index.php/nuestro-municipio-mita/nuestro-ambiente>.
36. Solís-Ramos, LY; Andrade-Torres, A. 2005. ¿Qué son los Marcadores Moleculares?: La Ciencia y El Hombre. Veracruz, Mexico, Universidad Veracruzana. Vol. XVIII.
37. Storey, WB. 1953. Genetics of the papaya. Oxford, England, Journal of Heredy.
38. Van-Buren, R; Zeng, F; Chen, C; Zhang, J; Man-Wai, C; Han, J; Miao, W. 2015. Origin and domestication of papaya Yⁿ chromosome. United States, Genome Research.
39. Vásquez, E. 2010. Producción y manejo postcosecha de papaya maradol en la finca huasteca. Tamaulipas, Mexico, INIFAPGIRNE.
40. Wilches, AV. 2004. Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. Ciudad de Guatemala, Guatemala, URL.



10. ANEXOS



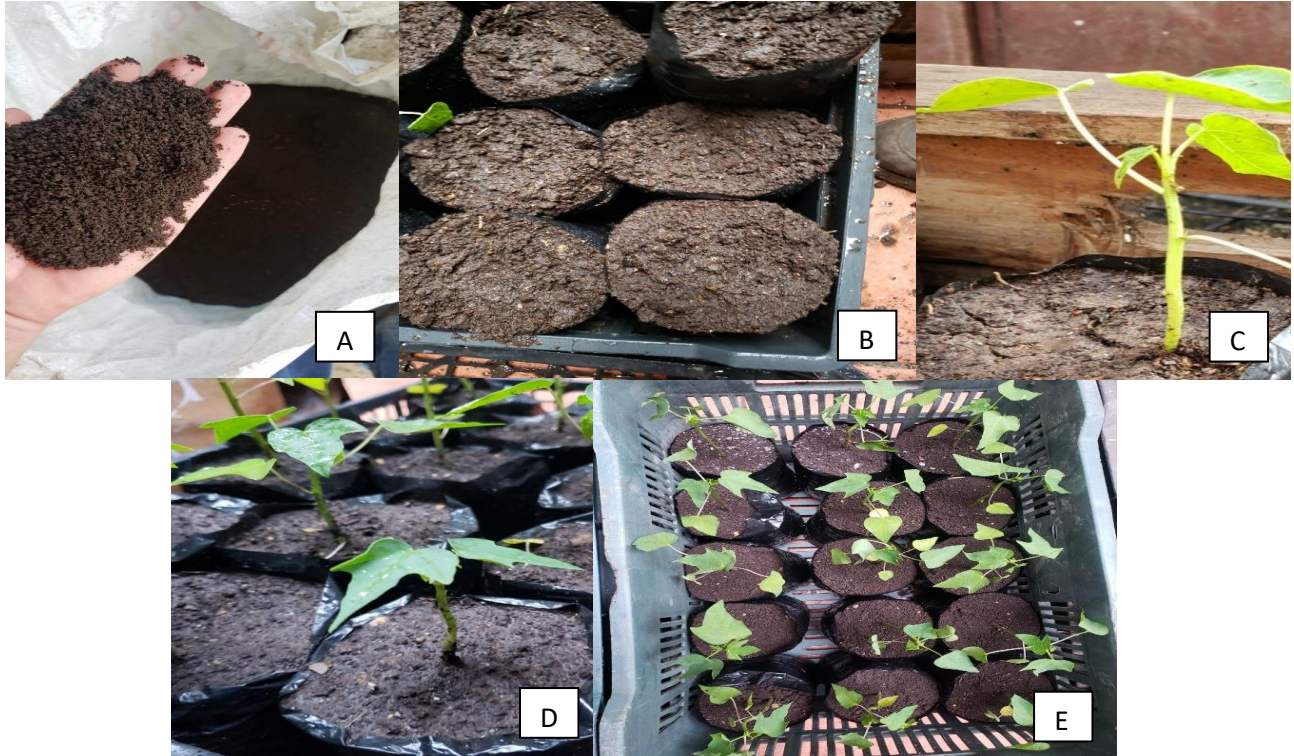
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 12A. Desempeño de los cebadores T1, W11 y T1/W11, en plantas hermafroditas y femeninas.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 13A. (A) Bolsa hermética de 1,000 semillas. (B) Semillas. (C) Tratamiento pre-germinativo en agua durante 48 h. (D) Siembra en bandejas de germinación utilizando peat moss como sustrato. (E) Pilonos de 8 días después de la germinación.



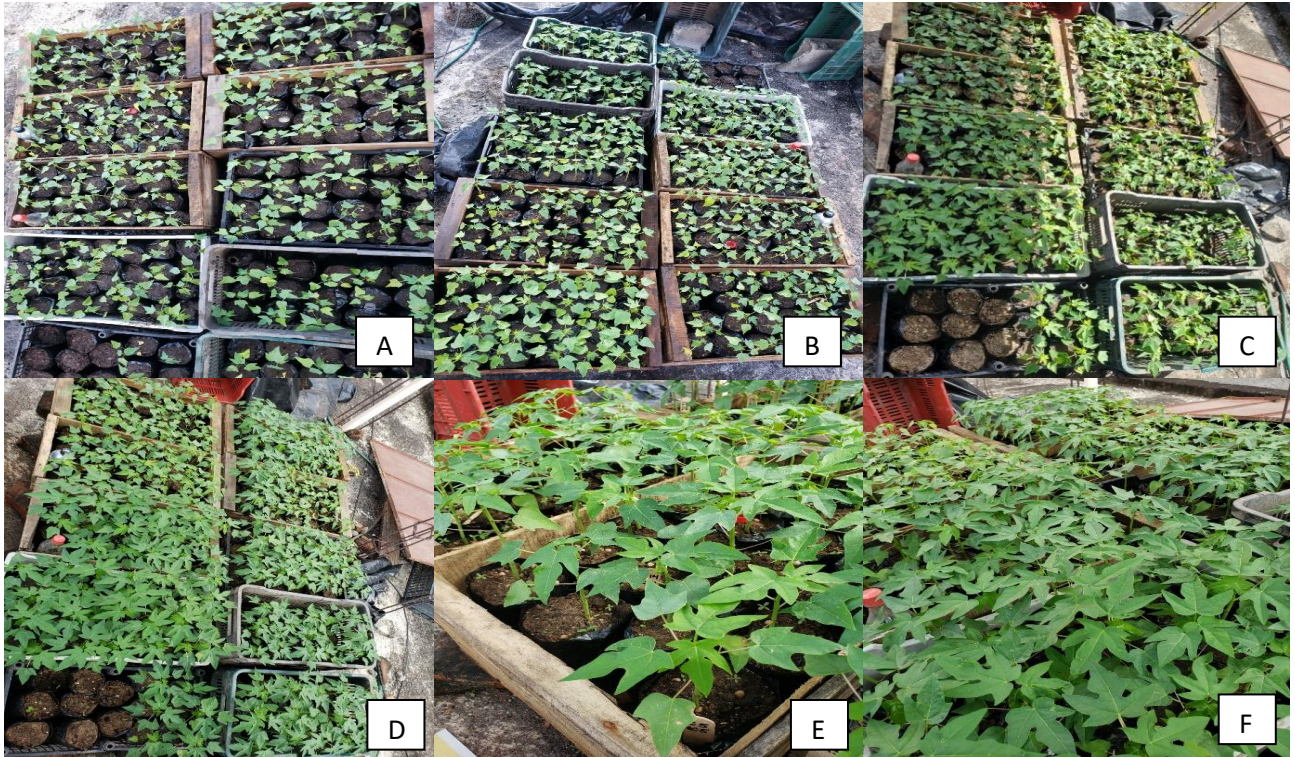
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 14A. (A) Sustrato (Suelo). (B) Llenado de bolsas de polietileno 6 inch x 9 inch. (C y D) trasplante de pilones a bolsas de polietileno. (E) Plántulas en vivero.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 15A. (A y B) Plántulas en vivero, bajo sarán con 70 % de sombra y sin condiciones controladas (expuestas al ambiente).



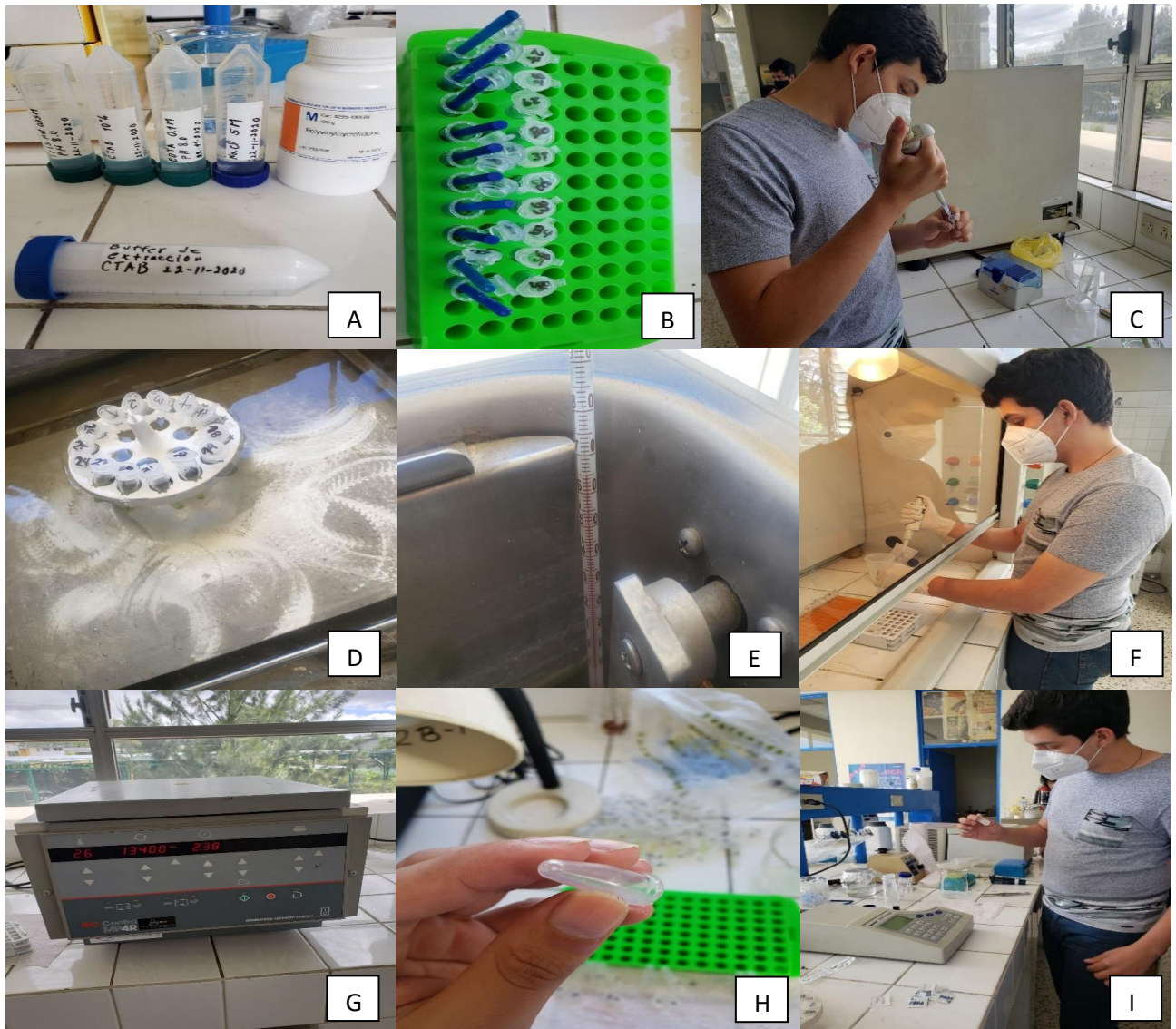
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 16A. (De A a E) Crecimiento de las plántulas en fase de vivero. (F) Plantas listas para el trasplante.



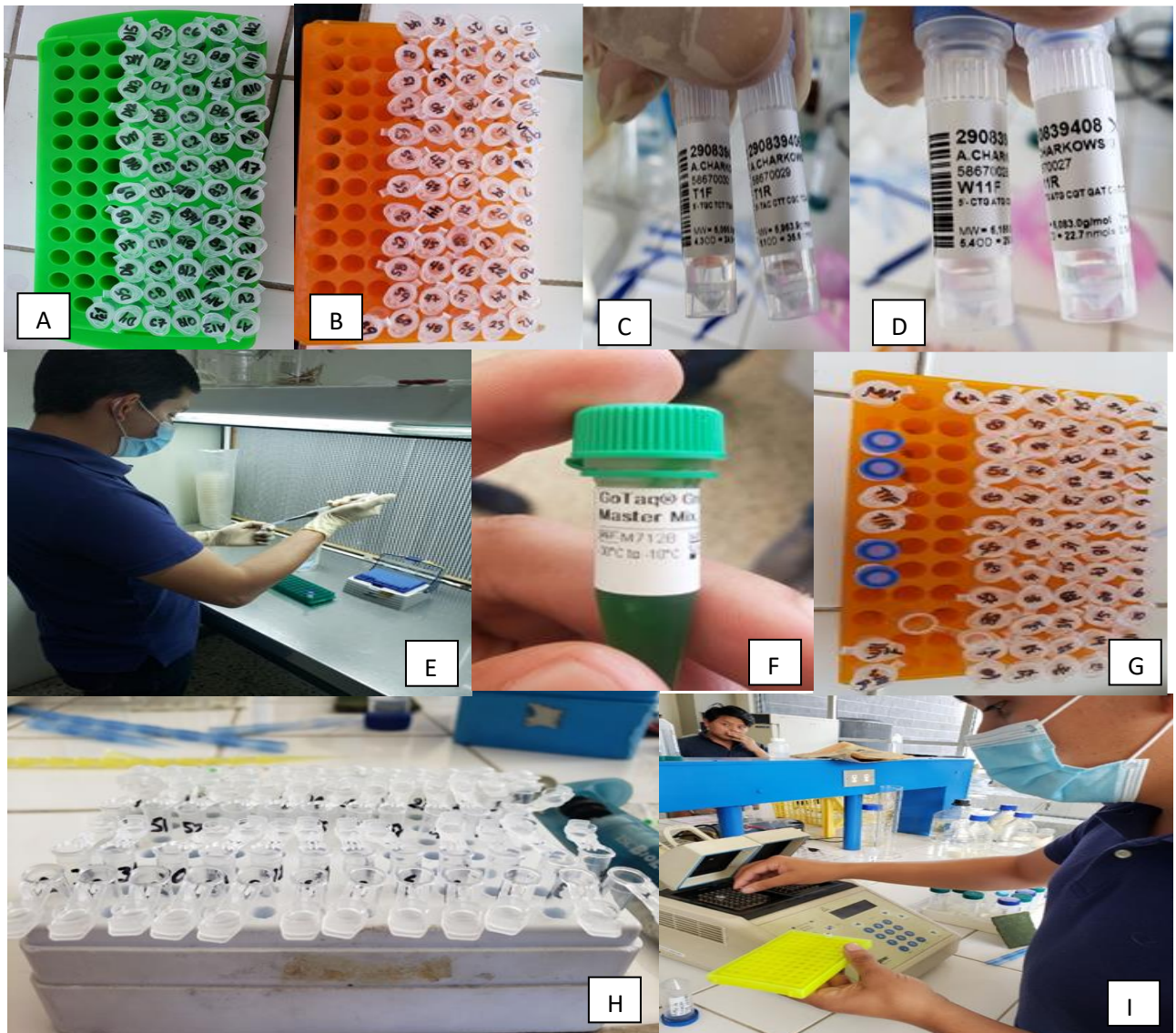
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 17A. (A) Codificación de plantas en vivero. (B) Desinfección con alcohol al 70 % de las herramientas y hielera para el transporte de muestras. (C) Muestras envueltas en papel periódico humedecido y colocadas dentro de bolsas herméticas y codificadas.



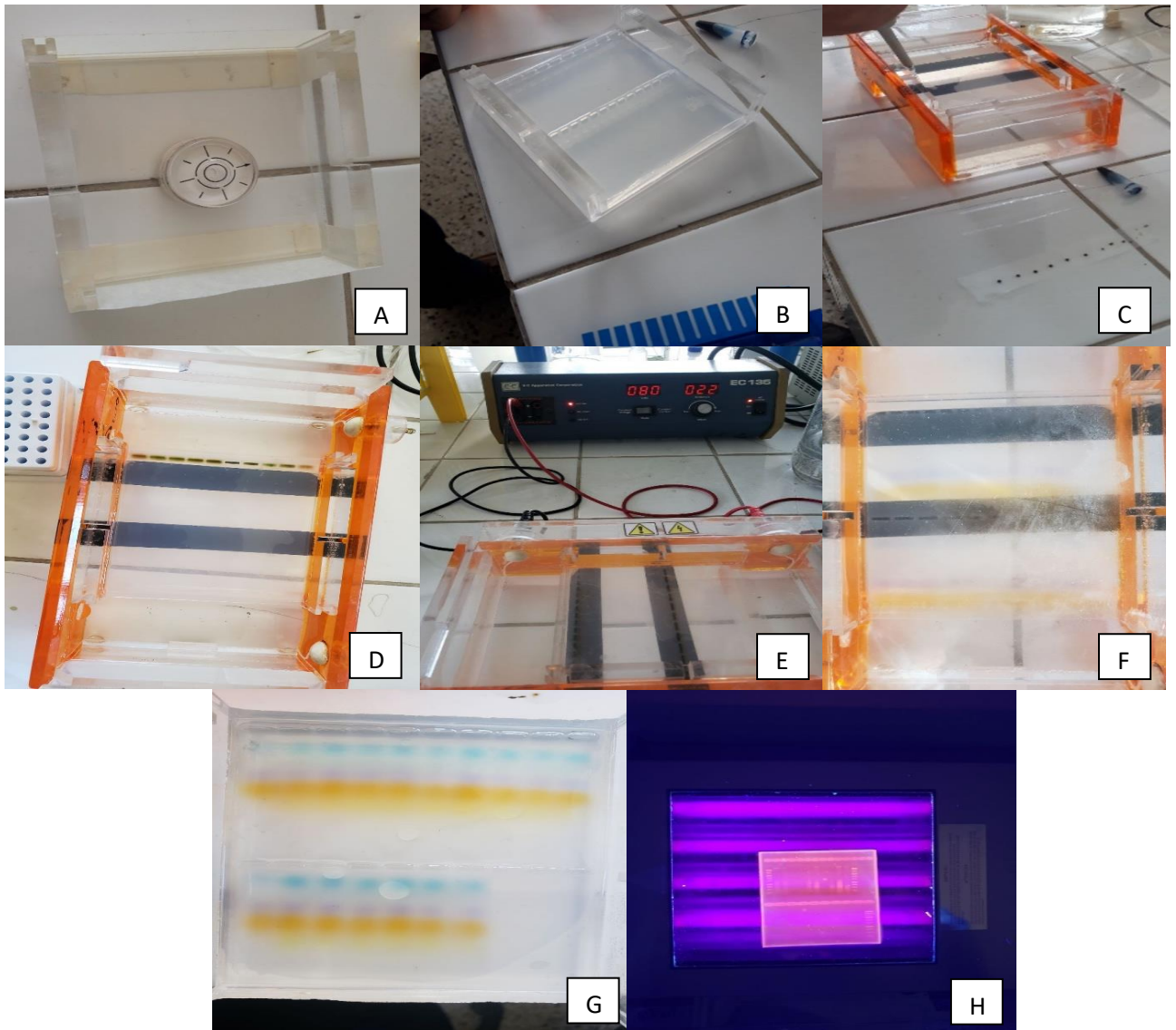
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 18A. (A) Reactivos para la elaboración del medio de extracción CTAB. (B) Maceración de la muestra vegetal. (C) Aplicación del medio de extracción a la muestra macerada. (D y E) Incubación a 65 °C durante 1 h. (F y G) Procedimiento de extracción de ADN. (H) Pastilla de ADN. (I) Cuantificación de la concentración y pureza del ADN.



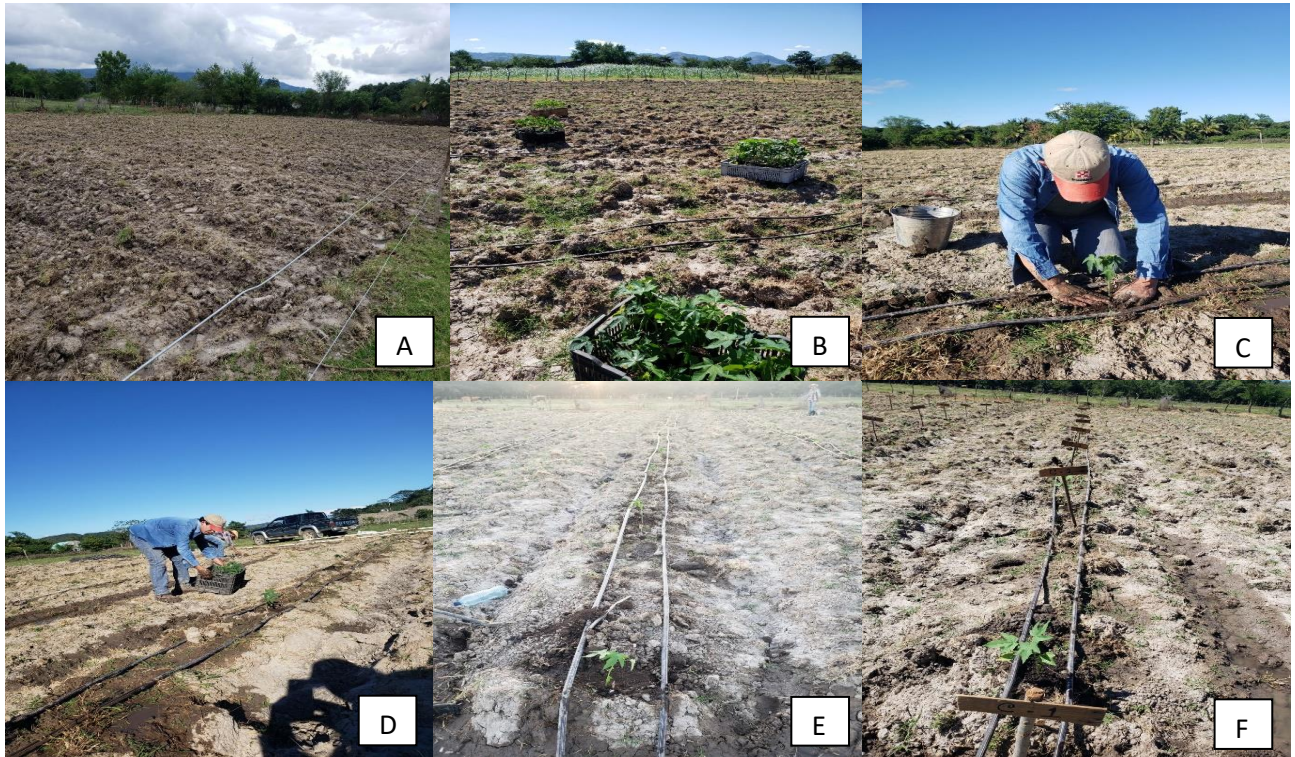
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 19A. (A y B) Muestras de ADN (60 muestras). (C y D) Cebadores T1F, T1R y W11F, W11R. (E) Preparación de cebadores. (F) Gotaq Green Master Mix 2X. (G y H) Preparación para la amplificación. (I) Amplificación mediante PCR.



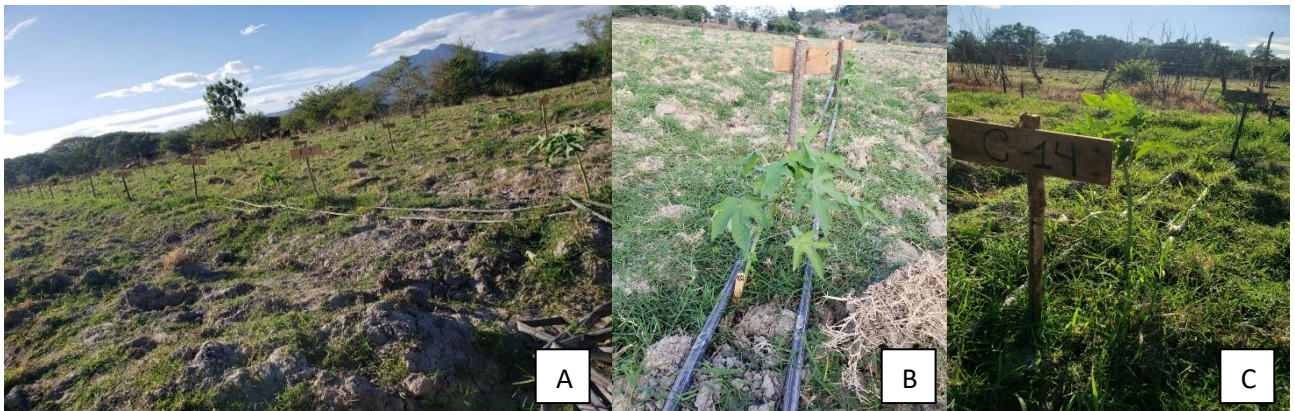
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 20A. (A) Preparación del molde (nivelado). (B). Gel de agarosa solidificado con los pocillos de carga. (C) Carga del gel dentro de la cámara de electroforesis. (D) Gel de agarosa cargada y tapada (E y D) Cámara de electroforesis conectada y funcionando. (G) Transporte de los productos de amplificación. (H) Revelación de los productos transportados en luz ultravioleta.



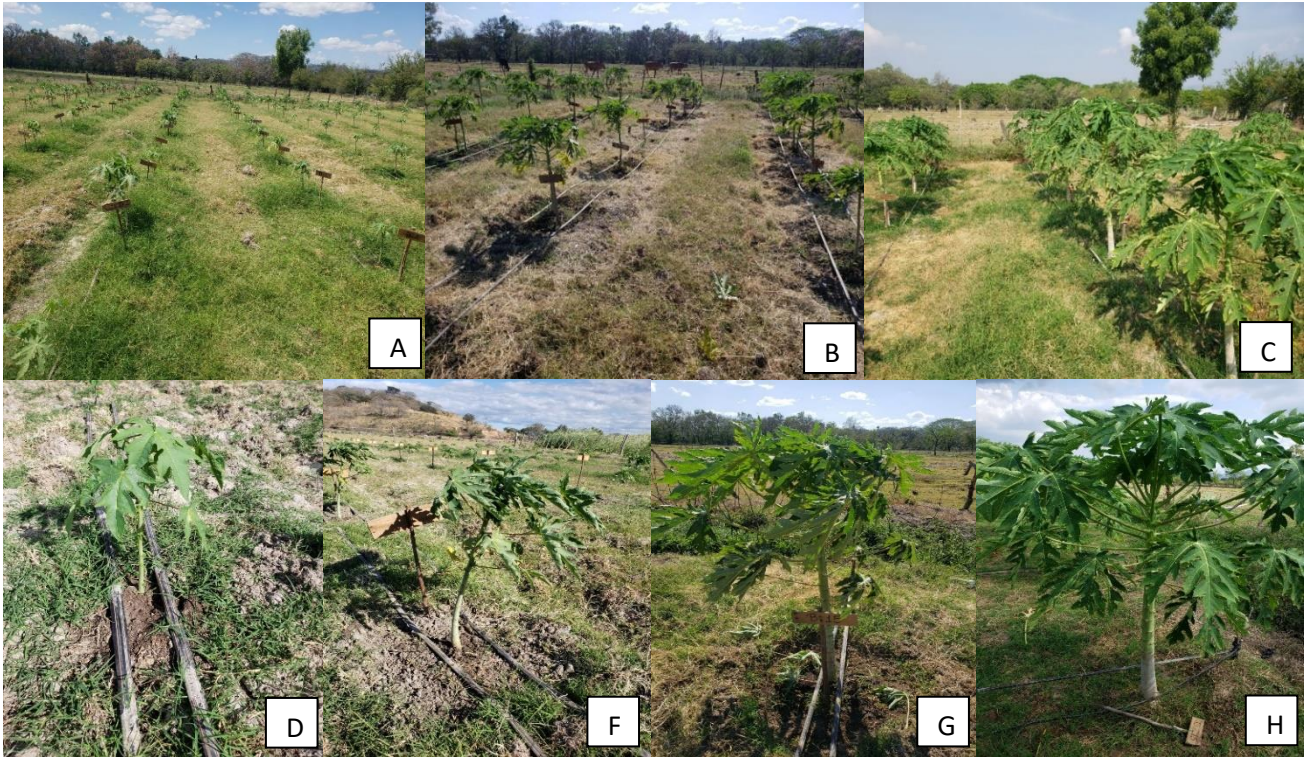
Fuente: elaboración propia, 2021

Figura 21A. (A) Preparación del terreno. (De B a E) Transporte de las plántulas y trasplante a campo. (F) Codificación de plantas en campo.



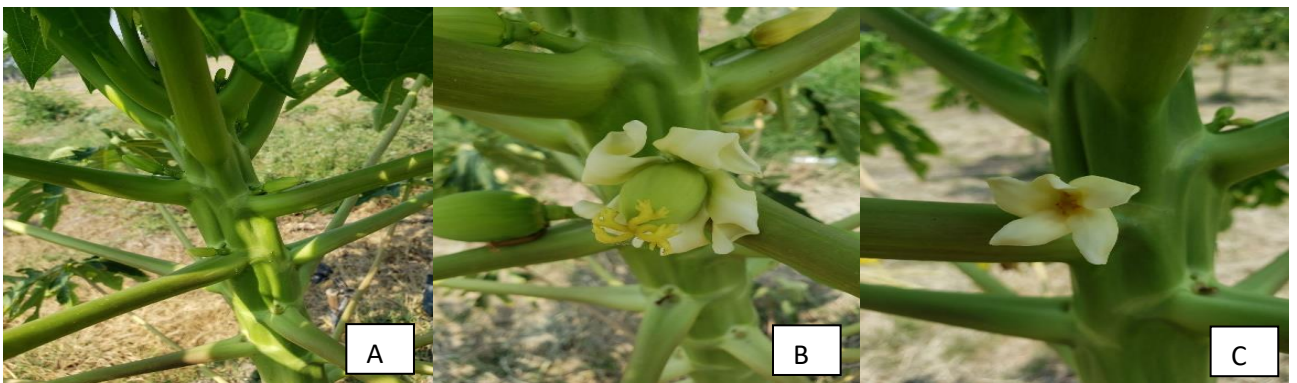
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 22A. Plantas en campo.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 23A. Crecimiento de las plantas en campo, desde el trasplante hasta el momento de la floración.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 24A. (A) Inicio de la floración. (B) Floración en plantas femeninas. (C) Floración en plantas hermafroditas.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 25A. Perdida de la unidad experimental C3 en campo antes de la floración.

DISTRIBUCION DE χ^2

Grados de libertad	Probabilidad										
	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,004	0,02	0,06	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,10	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	3,22	4,60	5,99	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,66	4,64	6,25	7,82	11,34	16,27
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47
5	1,14	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52
6	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,23	8,56	10,64	12,59	16,81	22,46
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32
8	2,73	3,49	4,59	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,12
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88
10	3,94	4,86	6,18	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59
	No significativo								Significativo		

Fuente: Wilches, 2004.

Figura 26A. Tabla de valores críticos de distribución de chi-cuadrado.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE AGRONOMÍA - FAUSAC -
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
 Y AMBIENTALES - IIA -



REF. Sem. 12/2022

LA TESIS TITULADA:

"EVALUACIÓN DEL USO DEL MARCADOR MOLECULAR TIPO SCAR EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PLANTAS DE PAPAYA (Carica papaya L.) HÍBRIDO TAINUNG-1, GUATEMALA, C.A."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

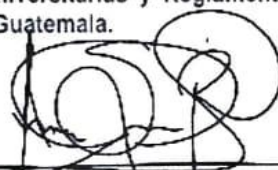
JUAN PABLO FIGUEROA AMÉZQUITA

CARNE:

201703333

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Edin Alejandro Gil
 Dr. Luis Roldolfo Montes Osorio

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.


 Dr. Gregorio Amilcar Sanchez Pérez
 ASESOR


 Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval
 ASESOR


 Ing. Agr. Carlos Fernando López Barrantes
 DIRECTOR DEL IIA



IMPRIMASE


 Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
 DECANO



CFLB/nm
 c.c. Archivo