Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.7 Núm.4 16 de mayo - 29 de junio, 2016 p. 767-780

Validación del uso de marcadores moleculares de sexo y color en híbridos obtenidos de cruzas de Maradol x papaya criolla*

Validation of the use of molecular markers of sex and color in hybrids derived from crosses of Maradol x creole papaya

Mariela Vázquez Calderón[1], Manuel Jesús Zavala León[3], Lorenzo Felipe Sánchez Teyer[1], Javier Orlando Mijangos Cortés[2], Matilde Margarita Ortiz García[2], Gabriela Fuentes Ortiz[1] y Jorge M. Santamaría[1§]

[1]Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C (CICY). (marielavc3@hotmail.com; santey@cicy.mx; gfuentescicy@gmail.com). [2]Unidad de Recursos Naturales, Investigación Científica de Yucatán A. C (CICY). Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, C. P. 97200, Mérida, Yucatán, México. Tel: (52) 999 942 83 30. (jomijangos@cicy.mx; arimat@cicy.mx). [3]INIFAP- Mocochá. Carretera Mérida-Motul, km 25 Mérida C. P. 97454, Mocochá, Yucatán. Tel: (01) 991 916 22 15. (zavala.manuel@inifap.gob.mx). [§]Autor para correspondencia: jorgesm@cicy.mx.

Resumen

La forma, tamaño y color de pulpa del fruto son aspectos que determinan su aceptación por el consumidor y prioritarios en el mejoramiento genético de papaya. El objetivo fue validar el uso de marcadores moleculares para seleccionar genotipos en términos del tipo sexual, color y tamaño del fruto. Genotipos (F1 y F2) derivados de la cruza intraespecífica L7xM22 fueron caracterizados molecularmente en etapa juvenil. Hasta los 6 a 9 meses se comparó con la clasificación basada en caracteres morfológicos. Se utilizó el marcador CPM1815Y52 (tipo sexual), el marcador CPFC1 (color de pulpa), así como ocho QTLs asociados al tamaño del fruto. El marcador CPM1815YC2 identificó plantas hermafroditas y femeninas en una proporción 2:1, en 100% de los genotipos F1 y F2 evaluados. Con el marcador CPFC1 se identificó que en la población F1, el 53.57% presentó pulpa amarilla naranja y 46.43% pulpa naranja-rojizo. En la F2, el alelo homocigoto recesivo de color naranja-rojizo se introgresó en 98.1%, 92.6% y 100% respecto a H90B, H70B y H77B. La predicción molecular del tipo floral y el color de pulpa, al comprobarse fenotípicamente en etapa de plántulas con 3 y 7 meses de anticipación a la presencia de flores y frutos es de gran utilidad en programas de mejoramiento asistido por

Abstract

The shape, size and color of fruit pulp are aspects that determine consumer acceptance and priority in the breeding papaya. The objective was to validate the use of molecular markers to select genotypes in terms of sexual type, color and size of the fruit. Genotypes (F1 and F2) derived from intraspecific crosses L7xM22 were characterized molecularly in juvenile stage. To 6 to 9 months compared to classification based on morphological characters. The CPM1815Y52 marker (sexual) was used, the marker CPFC1 (flesh color) as well as eight QTLs associated with fruit size. The CPM1815YC2 marker identified hermaphrodite and female plants in a 2: 1, 100% of F1 and F2 genotypes. With the score CPFC1 identified in the F1 population, 53.57% had orange yellow flesh and 46.43% orange-red pulp. In the F2, the homozygous recessive allele orange-reddish color introgression in 98.1%, 92.6% and 100% over H90B, H70B and H77B. The molecular prediction of floral type and color of pulp, checking phenotypically seedling stage 3 and 7 months before the presence of flowers and fruits is very useful in breeding programs assisted by markers, no QTL studied was able to predict the size or shape of fruit; further

* Recibido: diciembre de 2015
Aceptado: marzo de 2016

marcadores, Ningún QTL estudiado, fue capaz de predecir el tamaño, ni la forma de fruto; investigaciones posteriores serán necesarias para desarrollar QTLs (u otros marcadores moleculares) mejor relacionados al tamaño y forma de frutos de papaya de híbridos entre Maradol x material criollo.

Palabras clave: *Carica papaya* L., marcadores moleculares, morfología del fruto.

Introducción

La especie *Carica papaya* L. se cree que es nativa del sur de México y los países vecinos de América Central; actualmente, se distribuye a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Fuentes y Santamaría, 2014). Aunque México es uno de los principales productores de papaya, no cuenta con variedades locales. La variedad Maradol es ampliamente utilizada, en la que se ha demeritado la calidad de forma, tamaño (Posada *et al*., 2010) y el color de la pulpa del fruto. La forma de fruto en papaya depende de la variedad y del tipo de flor de la cual se haya formado. Por lo general, las flores femeninas generan frutos redondos o de esféricas a ovalados, mientras que las flores hermafroditas generan frutos alargados, cilíndricos, obovoides o pirifotrmes (Magdalita y Mercado, 2003).

En varios países los frutos alargados tienen mayor aceptación comercial (Manica, 1996; Alonso *et al*., 2008). En América Latina hay una fuerte preferencia por la papaya de frutos grandes en los mercados domésticos (Ferraguetti, 2003). De acuerdo a Marin *et al*. (2003) existe preferencia por plantas de papaya hermafroditas con formato periforme y alargado, lo que está asociado a una menor cavidad ovariana y un mayor espesor de la pulpa, característica que les confiere mayor valor comercial a este tipo de frutos en el mercado. Por lo tanto, es de interés conocer el sexo de los parentales para obtener un nuevo material cultivado con una segregación propicia de plantas hermafroditas que favorezcan la presencia de estos frutos. La predicción fenotípica del sexo en papaya es difícil en etapas tempranas de desarrollo de la planta (Sánchez-Betancourt y Nuñez, 2008). El colocar tres plantas por poceta y programar un aclareo a los tres meses después del trasplante, favorece la presencia de al menos una planta hermafrodita que producirá frutos alargados, sin embargo, se incrementan los gastos por manejo del cultivo (Kanchana-udomkan *et al*., 2014).

research is needed to develop better related to the size and shape of fruits of papaya hybrid between Maradol x creole materials QTLs (or other molecular markers).

Keywords: *Carica papaya* L., fruit morphology, molecular markers.

Introduction

The species *Carica papaya* L. is believed to be native to southern Mexico and neighboring Central American countries; currently, it is distributed through tropical and subtropical regions of the world (Fuentes and Santamaria, 2014). Although Mexico is one of the leading producers of papaya, it does not have local varieties. The Maradol variety is widely used, which has demerited quality shape, size (Posada *et al*., 2010) and the color of the fruit pulp. The shape of papaya fruit depends on the variety and type of flower which has formed. Usually female flowers generate round or spherical to oval fruits, while the hermaphrodite flowers produce elongated, cylindrical, obovoid or pirifotrmes fruits (Magdalita and Mercado, 2003).

In several countries elongated fruit have greater market acceptance (Manica, 1996; Alonso *et al*., 2008). In Latin America there is a strong preference for large papaya fruit in domestic markets (Ferraguetti, 2003). According to Marin *et al*. (2003) there is a preference for hermaphrodite papaya plants with pear-shaped, elongated format, which is associated with a lower ovarian cavity and thicker pulp, a feature that gives them greater commercial value to this kind of fruit in the market. Therefore, it is interesting to know the sex of the parent to obtain a new material cultivated with auspicious segregation hermaphroditic plants that favor the presence of these fruits. The phenotypic sex in papaya prediction is difficult in the early stages of plant development (Sanchez-Betancourt and Nuñez, 2008). The place three plants bowl and schedule a thinning three months after transplantation, favors the presence of at least one hermaphrodite plant to produce elongated fruit, however, expenditures increase for crop management (Kanchana-udomkan *et al*., 2014).

The DNA markers such as SCAR, RAPD, RFLP and DAF have been associated with sexual type in papaya plants (Deputy *et al*., 2002; Urasaky *et al*., 2002; Lemos

Marcadores de DNA tales como SCAR, RAPD, RFLP y DAF han sido asociados al tipo sexual en plantas de papaya (Deputy *et al*., 2002; Urasaky *et al*., 2002; Lemos *et al*., 2002; Chaves y Nuñez, 2007; Somsri y Bussabakornkul, 2008). Por su parte el color de los frutos depende de su composición de carotenoides. En papayas Hawaianas Solo de pulpa roja, Yamamoto, (1964) mostró que los frutos rojos acumulan licopeno que representa el 63% del contenido total de carotenoides. Por su parte los frutos amarillos deben su color a una acumulación de β-caroteno y β-criptoxantina, que representa 75% del contenido total de carotenoides. , mientras que la fruta de pulpa roja contiene aproximadamente la mitad de esa cantidad. Para determinar el color de pulpa que tendrán los frutos de una determinada variedad por métodos fenotípicos hay que esperar a que la planta produzca sus primeros frutos meses después. En papaya los primeros frutos son emitidos aproximadamente 7 meses después del trasplante (Calixto, 2011).

Entre 7 a 9 meses después del trasplante, cuando se generan los primeros frutos. En relación al tamaño de fruto, se puede observar una amplia variación en el tamaño de fruto de papaya. Reportándose rangos de longitud 7-30 cm (Asudi *et al*., 2010), y de peso de fruto desde menos de 100 g hasta 10 kg (Jiménez *et al*., 2014). Sin embargo, frutos comerciales presentan un rango de peso de 0.5-2.0 kg y una longitud de fruto de 10 a 20 cm (Samson, 1986). Demey *et al*. (2003) y Olmos (2004) sugieren que la identificación de secuencias de ADN próximas al gen o locus de interés agronómico se puede utilizar como una herramienta para acelerar los procesos de selección tradicionales del cultivo y facilitar el trabajo del fitomejorador. Blas *et al*. (2010) desarrollaron un marcador molecular (CPFC1) asociado con el color de pulpa de *Carica papaya* L. tipo Hawaiano y Chen *et al.* (2007) reportaron un marcador que identifica plantas hermafroditas y femeninas en papaya Sunup y AU9.

En la presente investigación, mediante la validación de marcadores moleculares se busca determinar desde temprana edad, el tipo sexual de la planta así como el color y tamaño de frutos para favorecer la selección temprana de materiales promisorios sin tener que esperar que los materiales produzcan flores y frutos, con la inminente reducción del tiempo para generar nuevas variedades. Para ello, se emplearon marcadores moleculares para tipo sexual, color de la pulpa y ocho QTLs asociados a características morfológicas del fruto en una población segregante de papaya derivada de la cruza entre un genotipo silvestre x uno comercial (var. Maradol). A plantas jóvenes tanto de los

et al., 2002; Chaves and Nuñez, 2007; Somsri and Bussabakornkul, 2008). Meanwhile the color of the fruit depends on the composition of carotenoids. Only in Hawaiian papayas red pulp, Yamamoto (1964) showed that red fruits accumulate lycopene representing 63% of total carotenoid content. Meanwhile yellow fruits owe their color to an accumulation of β-carotene and β-cryptoxanthin, which represents 75% of total carotenoid content. While red fruit pulp contains about half of that amount. To determine the color of the fruit pulp that have a certain variety by phenotypic methods have to wait for the plant to produce its first fruit months later. In the first fruits papaya are emitted approximately 7 months after transplantation (Calixto, 2011).

Between 7 to 9 months after transplantation, when the first fruits are generated. In relation to fruit size, you can see a wide variation in the size of papaya fruit. We recorded length ranges 7-30 cm (Asudi *et al*., 2010) and fruit weight from less than 100 g to 10 kg (Jimenez *et al*., 2014). However, commercial fruits have a weight range of 0.5-2.0 kg and a length of fruit from 10 to 20 cm (Samson, 1986). Demey *et al*. (2003) and Olmos (2004) suggest that the identification of DNA sequences close to the gene or locus of agronomic interest can be used as a tool to accelerate the processes of traditional crop selection and facilitate the work of plant breeders. Blas *et al*. (2010) developed a molecular marker (CPFC1) associated with the color pulp *Carica papaya* L. Hawaiian type and Chen *et al*. (2007) reported a marker that identifies hermaphrodite and female plants in papaya Sunup and AU9.

In this research, by validating molecular markers is to determine at an early age, sexual type of the plant as well as the color and size of fruit to encourage early selection of promising materials without having to wait for materials to produce flowers and fruits, with the imminent reduction in time to generate new varieties. For this, molecular markers for sexual type, color pulp eight QTLs associated with morphological characteristics of the fruit were used in a segregating population of papaya derived from the cross between a wild genotype x commercial one (var. Maradol). A young plants of both the parent and the materials derived from the cross, they extracted DNA and classified based on the results based on molecular markers analysis, months later, the grouping based on these markers, was collated with the grouping based on visual and morphological characteristics of flowers and fruits of these plants.

parentales como de los materiales derivados de la cruza, se les extrajo ADN y se clasificaron en base a los resultados del análisis basado en marcadores moleculares, meses después, el agrupamiento basado en dichos marcadores, fue cotejado con el agrupamiento basado en la caracterización visual y morfológica de flores y frutos de las mismas plantas.

Materiales y métodos

Material vegetal

El experimento se desarrolló en dos periodos: octubre 2009 a mayo 2010 y septiembre 2012 a abril 2013, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY) en Mérida Yucatán México La temperatura media anual del sitio experimental es de 26.1 °C y una precipitación de 1,012 mm (Conagua). A partir de la cruza entre papaya Criolla línea 7 (hermafrodita, pulpa amarilla-naranja) y papaya Maradol 22 (hermafrodita, pulpa naranja-rojiza), se desarrollaron 42 plántulas F1 y se realizaron autopolinizaciones de H90B, H77B y H70B (genotipos F1) para el desarrollo de 162 plántulas F2 de las cuales 83% de la población fue descartada para la evaluación por el ataque de una enfermedad viral. La presente investigación se realizó a cielo abierto en un vivero con cerca perimetral. Las plantas se manejaron bajo riego con adecuada fertilización y control de plagas y malezas siguiendo el paquete tecnológico descrito en (Cituk, 2006). Los progenitores son materiales homogéneos y estables.

Caracterización molecular

Se empleó material foliar de las plántulas F1 y F2 y se utilizó un método de extracción de ADN basado en CTAB sugerido por Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones. Mediante PCR fueron amplificados los marcadores moleculares CPM1815YC2 (Chen et al, 2007) y CPFC1 (Blas *et al*., 2010) asociados con el carácter de sexo y color de pulpa, respectivamente; además de marcadores QTLs asociados a la morfología del fruto tales como: P3K1700CC, ctg-43C0, CPM1556C0 y P3K4311bK0 para peso, P3K6372CC y P6K969CC para longitud, CPM1550C0 para diámetro y P3K2426aK3 para forma (Blas, 2008). Los fragmentos fueron visualizados a través de electroforesis en agarosa al 5%. El tamaño de fragmento esperado fue calculado *in silico* con el software prfectBLAST, el cual indicó la migración aproximada del producto amplificado para los marcadores moleculares en parentales (L7 y M22) y progenie F1 y F2.

Materials and methods

Vegetal material

The experiment was conducted in two periods: october 2009 to may 2010 and september 2012 to april 2013, the Scientific Research Center of Yucatán A. C. (CICY) in Merida, Yucatan, Mexico. The average annual temperature of the experimental site is 26.1 °C and precipitation 1.012 mm (Conagua). From the cross between creole papaya line 7 (hermaphrodite, pulp yellow-orange) and papaya Maradol 22 (hermaphrodite, orange-red pulp), the 42 seedlings F1 were developed and self-pollinations of H90B, H77B and H70B (genotypes F1) were performed for the development of 162 seedlings F2 of which 83% of the population was ruled out for evaluation by the attack of a viral illness. This research was conducted opencast in a nursery with perimeter fence. The plants were irrigated handled with proper fertilization and pest and weed control following the technology package described in (Cituk, 2006). The parents are homogeneous and stable materials.

Molecular characterization

The leaf material F1 and F2 seedlings was used and a method of DNA extraction based was used on CTAB suggested by Doyle and Doyle (1990), with some modifications. They were amplified by PCR molecular markers CPM1815YC2 (Chen *et al*., 2007) and CPFC1 (Blas *et al*., 2010) associated with the character of sex and color of pulp, respectively; QTLs associated markers addition to fruit morphology such as P3K1700CC, ctg-43C0, CPM1556C0 and P3K4311bK0 for weight P3K6372CC and P6K969CC for length, CPM1550C0 for diameter and P3K2426aK3 to form (Blas, 2008). The fragments were visualized by agarose electrophoresis 5%. The expected fragment size was calculated *in silico* with prfectBLAST software, which indicated the approximate migration of the amplified for molecular markers in parental (L7 and M22) and progeny F1 and F2 product.

Morphological characterization

Throughout the F1 progeny and only 17% of population F2 three fruits per plant were harvested at physiological maturity, this maturity was determined according to Santamaria *et al*. (2009). The fruits were transported to the laboratory of Molecular Physiology CICY and weight were evaluated, the length, diameter and shape and color of the fruit-based descriptors reported by the UPOV (2010).

Caracterización morfológica

En toda la progenie F1 y solo en 17% de población F2 se colectaron tres frutos por planta en madurez fisiológica, esta madurez se determinó de acuerdo a Santamaría *et al*. (2009). Los frutos fueron transportados al laboratorio de Fisiología Molecular del CICY y se evaluaron el peso, la longitud, el diámetro y la forma y el color del fruto basado en los descriptores reportados por la UPOV (2010).

Análisis estadístico

El análisis de componentes principales de la matriz de correlación entre los caracteres morfológicos evaluados y normalizados se realizó utilizando el sistema taxonómico numérico (NTSYS 2.1).

Resultados y discusión

Análisis molecular

Los marcadores moleculares ligados a caracteres de interés comercial QTL (quantitative trait loci por su siglas en inglés), constituyen una herramienta para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético tradicionales; ya que sirven para identificar, seleccionar y mantener los genotipos que contienen la combinación de alelos deseados y para descartar aquellas que no los presenten; permitiendo una disminución en la demanda de tiempo y recursos en los estudios encaminados en la selección de genotipos *elites* (Valadez y Gûnter, 2000).

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

El tamaño del fragmento esperado del marcador molecular CPM1815YC2 que se predijo mediante el programa bioinformático prfectBLAST (Santiago y Ramírez, 2012) fue de 167 pb. Este marcador molecular ligado al tipo sexual de *Carica papaya* L. amplificó una doble banda o una sola banda, dependiendo del tipo de planta analizada. El tamaño de amplicón en genotipos con doble banda corresponde a 175 y 195 pb, respectivamente, mientras que en genotipos con una sola banda fue de 190 pb (Figura 1a). Los parentales Criolla Línea 7 y Maradol 22 presentaron doble banda amplificada, ya que ambos son plantas hermafroditas. De la misma manera, se presentó doble banda en 28 genotipos F1,

Statistical analysis

The principal component analysis of the correlation matrix between evaluated and standardized morphological characters was performed using the numerical taxonomic system (NTSYS 2.1).

Results and discussion

Molecular analysis

The molecular markers linked to QTL characters of commercial interest (quantitative trait loci for its acronym in English) are a tool to increase the efficiency of traditional breeding programs; as they serve to identify, select and maintain genotypes containing the combination of desired alleles and to discard those that do not occur; allowing a decrease in demand for time and resources in studies aimed at the selection of *elite* genotypes (Valadez and Gunter, 2000).

Molecular marker CPM1815YC2: sex identification *Carica papaya* L.

The size of the expected fragment molecular marker CPM1815YC2 was predicted bioinformatic program by prfectBLAST (Santiago and Ramirez, 2012) was 167 bp. This molecular marker linked to the sexual nature of *Carica papaya* L. amplified a double band or single-band, depending on the type of plant analyzed. The amplicon size genotypes dual band corresponds to 175 and 195 bp respectively, while in genotypes with a single band of 190 bp (Figure 1a). The creole parental Line 7 and Maradol 22 had double amplified band, as both are hermaphroditic plants. Similarly, double band appeared in 28 genotypes F1, while the remaining 14 individuals F1 plants corresponding to one female (Figure 2a) band was observed. In the F2 progeny of self-pollination generated H90B, H77B and H70B showed 35, 40 and 39 genotypes dual-band, and 19, 14 and 15 genotypes with a single amplified band, respectively (Figure 3a).

These results agree with those reported by Chen *et al*. (2007) who tested this molecular marker in Hawaiian papaya materials and identified as female and hermaphrodite genotype AU9 and Sunup, respectively with a double band respectively. Our data show that 42 plants in the F1 progeny are hermaphrodites 66.6% and 33.3% are female (ratio 2: 1; hermaphrodites: female). This relationship is expected in an

mientras que en los 14 individuos F1 restantes se apreció una sola banda correspondiente a plantas de sexo femenino (Figura 2a). En la progenie F2 generada por la autopolinización de H90B, H77B y H70B se presentaron 35, 40 y 39 genotipos con doble banda, y 19, 14 y 15 genotipos con una sola banda amplificada, respectivamente (Figura 3a).

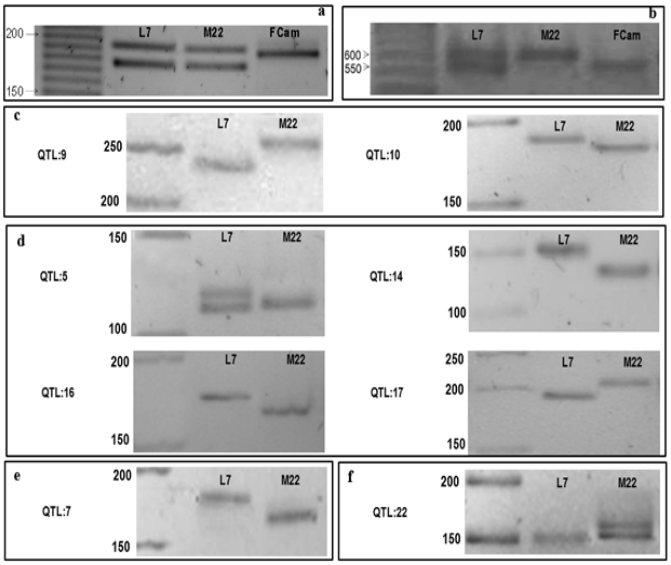

Figura 1. Electroforesis del marcador molecular de sexo CPM1815YC2 (a) y de color de pulpa CPFC1 (b) amplificado en parentales Criolla línea 7, Maradol 22 y una planta silvestre femenina y pulpa amarilla clara de *Carica papaya* L., y de ocho QTLs asociados a longitud (c), peso (d), diámetro (e) y forma (f) del fruto, en gel de agarosa de alta resolución al 5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 10 pb y 50 pb.

Figure 1. Electrophoresis molecular marker sex CPM1815YC2 (a) and colored pulp CPFC1 (b) amplified parental Creole line 7, Maradol 22 and a female wild plant and light yellow pulp *Carica papaya* L., and eight QTLs associated length (c), weight (d), diameter (e) and form (f) of the fruit, agarose gel high resolution 5% stained with ethidium bromide. Molecular weight marker 10 bp and 50 bp.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Chen *et al.* (2007) quienes probaron este marcador molecular en materiales de papaya Hawaiana e identificaron como genotipo femenino y hermafrodita a AU9 y Sunup, respectivamente con una y doble banda respectivamente. Nuestros datos arrojan que de 42 plantas en la progenie F1, 66.6% son hermafroditas y 33.3% son femeninas (relación 2:1; hermafroditas:femeninas). Dicha relación es la esperada en una segregación alélica de una planta hermafrodita autofecundada o de ambos parentales herms como lo reportan Ming *et al*. (2007); Niroshini, *et al*. (2008).

allelic segregation of a selfed hermaphrodite plant or both parents herms as reported by Ming *et al*. (2007); Niroshini, *et al*. (2008).

While in the F2 progeny derived from self-pollination of H70B, H77B and H90B presented on the one hand 72.2%, 74.4% and 64.8% of allelic condition hermaphrodite, and 27.8%, 25.9% and 35.2% female, respectively allelic condition. These results are consistent proportionately with those reported by Esquivel *et al*. (2008) for HGxMR cultivars (65.5 and 34.5%, hermaphrodite and female, respectively), HGxMA (57.8 and 42.2%, hermaphrodite and female, respectively) and Red Maradol (68.9 and 31.04%).

Sexual *Carica papaya* L. type can only be displayed until started flowering (from three months after transplant approximately) as reported Ming *et al*. (2007); Niroshini, *et al*. (2008); Reddy *et al*. (2012). So determining the sex of papaya seedlings at the molecular level before transplantation would be an advantage in saving time, space and money for the breeder, being a complement to the traditional selection of suitable plants for fruit production agreement with market demands or to incorporate them into the program selection and breeding of the species (Sánchez-Betancourt and Nuñez, 2008).

In addition, papaya fruits from hermaphrodite flowers are generally elongated, with sufficient strength to withstand the mechanical post-harvest and higher commercial demand for occupying less space per unit volume at the time of packaging damage, representing savings freight; mainly for export markets (Muñozcano and Martinez, 2009). The validation of the marker CPM1815YC2 to discriminate female plants hermaphroditic in 42 genotypes F1 (from L7xM22) and 162 genotypes F2 derived from self-pollination of H70B, H77B and H90B is reliable because it was achieved at the molecular level to identify and classify 100% both sex types in papaya plants which shows great potential for use in marker-assisted selection (SAM) in other genotypes wild, creoles and commercial.

Molecular marker CPFC1: color identification *Carica papaya* L.

The coloring papaya pulp, besides the size and shape of the fruit is an aspect that determines its acceptance by the consumer. From a nutritional standpoint, identifying and obtaining materials aimed at obtaining *Carica papaya* L. with orange-red pulp favors the presence of a higher content of lycopene, which gives it the orange-red color to the fruit

Mientras que en la progenie F2 obtenida de la autopolinización de H70B, H77B y H90B presentaron por un lado 72.2%, 74.4% y 64.8% de condición alélica hermafrodita, y 27.8%, 25.9% y 35.2% de condición alélica femenina, respectivamente. Estos resultados concuerdan de manera proporcional con lo reportado por Esquivel *et al.* (2008) para los cultivares HGxMR (65.5 y 34.5%, hermafroditas y femeninas, respectivamente), HGxMA (57.8 y 42.2%, hermafroditas y femeninas, respectivamente) y Maradol Roja (68.9 y 31.04%).

El tipo sexual en *Carica papaya* L. solo puede ser visualizado hasta iniciada la floración (a partir de los tres meses después del trasplante aproximadamente) como lo reportaron Ming *et al*. (2007); Niroshini, *et al*. (2008); Reddy *et al*. (2012). De manera que la determinación del sexo de las plántulas de papaya a nivel molecular antes del trasplante sería una ventaja en ahorro de tiempo, espacio y dinero para el fitomejorador, siendo un complemento de la selección tradicional de plantas aptas para la producción de frutos de acuerdo con las exigencias del mercado, o para incorporarlas al programa de selección y mejora genética de la especie (Sánchez-Betancourt y Nuñez, 2008).

Además, los frutos de papaya provenientes de flores hermafroditas, generalmente son de forma alargada, con firmeza suficiente para resistir los daños mecánicos poscosecha y de mayor demanda comercial por ocupar menor espacio por unidad de volumen al momento del empaque, lo que representa un ahorro en el flete; principalmente para mercados de exportación (Muñozcano y Martínez, 2009). La validación del marcador CPM1815YC2 para discriminar plantas femeninas de las hermafroditas en 42 genotipos F1 (provenientes de L7xM22) y 162 genotipos F2 derivados de la autopolinización de H70B, H77B y H90B es confiable ya que se logró a nivel molecular identificar y clasificar al 100% ambos tipos sexuales en plantas de papaya lo que muestra un gran potencial para su uso en la selección asistida por marcadores (SAM) en otros genotipos silvestres, criollos y comerciales.

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

La coloración de pulpa en papaya, además del tamaño y forma del fruto es un aspecto que determina su aceptación por el consumidor. Desde el punto de vista nutricional, la identificación y obtención dirigida a obtener materiales de *Carica papaya* L. con pulpa naranja-rojizo favorece la presencia de un mayor contenido de licopeno, lo que

pulp. The intensity of the color depends on the concentration of this pigment, which acts as antioxidants to benefit human health by reducing the risk of lung, stomach and prostate (Giovannucci, 1999) cancer. While in genotypes yellow fruit pulp, the content of β-carotene is higher than the content of lycopene. With the color marker pulp (CPFC1) three allelic forms were observed in the progeny evaluated.

The parental M22 whose phenotypic characteristic was having reddish-orange pulp and 13 genotypes F1 showed a single band with size of 600 bp, which is homozygous recessive condition allelic. While the parental L7, which has yellow flesh and 15 individuals F1 dual band presented a 600-bp and 550 bp another characteristic allelic heterozygous genotypes. In addition, a wild material (FCam) was analyzed with color from light yellow flesh and a band of 550 bp was observed; that is, its condition is homozygous dominant allele (Figure 1b and 2b), these data were close to 568 bp calculated by prfectBLAST.

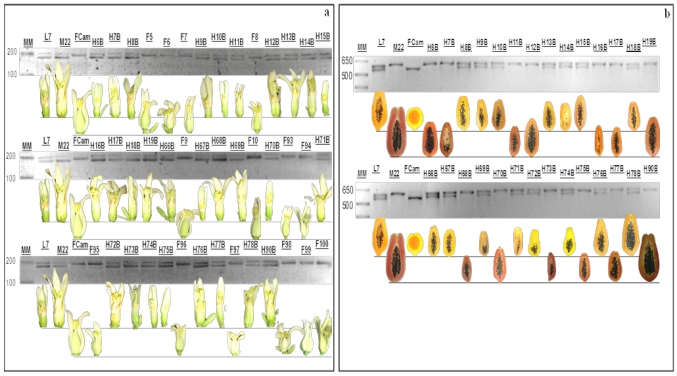

Figura 2. Electroforesis del marcador molecular de sexo CPM1815YC2 (a) y de color de pulpa CPFC1 (b) amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F1 provenientes de la cruza L7xM22 de *Carica papaya* L. L7: población Criolla línea 7, M22: Maradol 22, FCam: femenina silvestre, H: plantas hermafroditas en gel de agarosa al 5% teñido con bromuro de etidio. MM: 1 Kb. Se incluye la fotografía de la flor y fruto correspondiente a cada progenie F1, obtenida a los 6 y 9 meses después de haber tomado la muestra de ADN, respectivamente.

Figure 2. Electrophoresis molecular marker sex CPM1815YC2 (a) and colored pulp CPFC1 (b) parental Criolla amplified L7, Maradol 22 and F1 progeny derived from the cross of *Carica papaya* L. L7xM22 L7: population Creole line 7, M22: Maradol 22, CFFM: wild female, H: hermaphroditic plants agarose gel 5% ethidium bromide stained. MM: 1 Kb. The photography is included flower and fruit for each F1 progeny obtained at 6 and 9 months after taking the DNA sample, respectively.

le imprime el color naranja-rojizo a la pulpa del fruto. La intensidad del color depende de la concentración de este pigmento, el cual actúa como antioxidantes en beneficio de la salud humana, al reducir el riesgo de padecer cáncer de pulmón, estómago y próstata (Giovannucci, 1999). Mientras que en genotipos con frutos de pulpa amarilla, el contenido de β-carotenos es mayor que el contenido de licopeno. Con el marcador de color de pulpa (CPFC1) se observaron tres formas alélicas en la progenie evaluada.

El parental M22 cuya característica fenotípica fue de poseer pulpa naranja-rojizo y 13 genotipos F1 presentaron una sola banda con tamaño de 600 pb, cuya condición alélica es homocigota recesiva. Mientras que el parental L7, el cual posee pulpa amarilla y 15 individuos F1 presentaron doble banda una de 600 pb y otra de 550 pb, característica alélica de genotipos heterocigotos. Además, se analizó un material silvestre (FCam) con color de pulpa amarilla claro y se observó una banda de 550 pb; es decir, su condición alélica es homocigota dominante (Figura 1b y 2b), estos datos resultaron próximos a las 568 pb calculado mediante prfectBLAST

A nivel molecular, la proporción en la población F1 fue aproximadamente de 53.57% para genotipos con pulpa amarilla, y de 46.43% para genotipos con pulpa naranja-rojizo (relación 1:1 aprox.) (Figura 2b). Dentro de la progenie F2 evaluada se observó que el alelo recesivo de color naranja-rojizo se introgresó en un 100% para la progenie F2 provenientes del genotipo H90B, en 98.1% de los genotipos provenientes de H70B y en 92.6% de los genotipos provenientes de H77B (Figura 3b). Cabe resaltar, que en la población F2 proveniente de H70B, el genotipo H70-57 presentó condición heterocigota segregante del parental L7, por otra parte, en la población F2 provenientes de H77B, los genotipos H77-12, H77-52, y H77-54, presentaron condición heterocigota segregante del parental L7 y solamente el genotipo H77-43 presentó condición homocigota dominante semejante a la que presenta la FCam.

La condición alélica obtenida con el marcador de color CPFC1 en la progenie F1 y F2 de esta investigación coincidió con la que reportaron Blas *et al.* (2010), quienes indican que el material SunUp de color de pulpa roja amplifica una sola banda y tiene condición homocigota recesiva, mientras que los híbridos Rainbow y Richter presentan

At the molecular level, the ratio F1 population was approximately 53.57% for genotypes with yellow pulp, and 46.43% for genotypes with reddish-orange pulp (ratio 1:1 approximately) (Figure 2b). Within the F2 progeny tested was observed that the recessive allele of orange-red color introgression 100% for F2 progeny from genotype H90B, in 98.1% of the genotypes from H70B and 92.6% of the genotypes from H77B (Figure 3b). Significantly, in the F2 population from H70B, heterozygous genotype H70-57 presented segregating parental condition L7, moreover, in the F2 population from H77B, the genotypes H77-12, H77-52, and H77- 54, they presented segregating parental heterozygous condition L7 and only genotype homozygous dominant H77-43 presented condition similar to that presented the FCam.

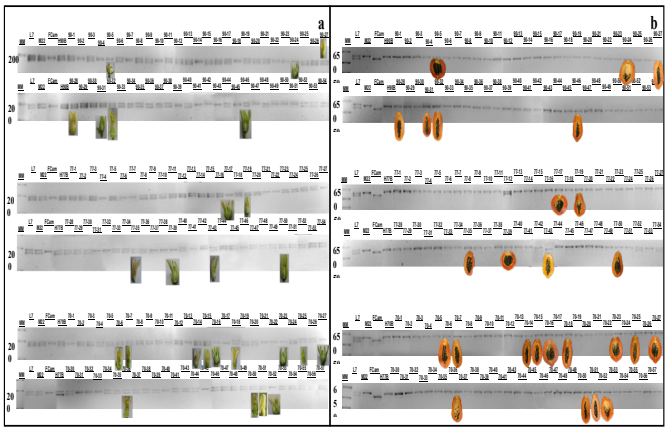

Figura 3. Electroforesis del marcador molecular de sexo CPM1815YC2 (a) y de color de pulpa CPFC1 (b) amplificado en parentales Criolla L7, Maradol 22 y progenie F2 provenientes de la autopolinización de H90B, H77B y H70B en *Carica papaya* L. L7: población Criolla línea 7, M22: Maradol 22, FCam: femenina silvestre, H: plantas hermafroditas en gel de agarosa al 5% teñido con bromuro de etidio. MM: 1 Kb. Se incluye la fotografía de flor y fruto correspondiente a cada progenie F2, obtenida a los 9 meses después de haber tomado la muestra de ADN.

Figure 3. Electrophoresis of molecular marker sex CPM1815YC2 (a) and colored pulp CPFC1 (b) parental Creole amplified L7, Maradol 22 F2 progeny from selfing of H90B, H77B and H70B in *Carica papaya* L. L7: population Creole line 7, M22: Maradol 22, CFFM: wild female, H: hermaphroditic plants agarose gel 5% ethidium bromide stained. MM: 1Kb. The photography flower and fruit for each progeny F2 obtained at 9 months after taking the DNA sample is included.

pulpa amarilla y tienen condición heterocigota, es decir, contienen dos alelos manifestando una amplificación de doble bandas. También mencionaron que el material Kapoho presenta color de pulpa amarilla pero posee una condición homocigota dominante. Al respecto, Rodríguez (2008) reportó que la característica de pulpa amarilla (alelo dominante) predomina sobre la pulpa naranja-rojiza, por lo que en las poblaciones silvestres de papaya rara vez aparecen frutos naranja-rojizos, debido a que este color está dado por genes recesivos.

El marcador molecular de color de pulpa (CPFC1) en genotipos F1 y F2 provenientes de la cruza L7xM22 facilitó la detección temprana de genotipos con pulpa naranja-rojizo (fenotípicamente podría ser obtenida a los 7-9 meses después del trasplante) y logró una correlación tanto molecular como morfológica en lo que se refiere a la proporción de segregación esperada. De manera que este marcador específico también puede tener un uso potencial importante en la selección asistida por marcadores (SAM) para el carácter de color de pulpa, empleado en forma temprana en plantas de vivero sin tener que esperar hasta 9 meses para visualizar el color del fruto de los genotipos usados en programas de mejoramiento genético de papaya.

Marcadores QTLs asociados a la morfología del fruto de *Carica papaya* L.

Los tamaños de fragmentos obtenidos in silico con valores entre 84 pb a 174 pb (datos no mostrados) fueron los esperados y aproximados a los QTLs microsatélites (SSR) amplificados por PCR, en parentales L7, M22 y progenie F1 y F2 (Figura 4), además congruentes con lo reportado por Mittal y Dubey, (2009) quienes mencionan que los fragmentos amplificados de SSR son de tamaño variante, generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases (pb), codominantes, polimorficos y de segregación mendeliana, atributos que pudieron constatarse en esta investigación.

Los ocho QTLs asociados a caracteres de morfología de fruto en parentales L7 y M22, se presentan en la Figura (1 c-f) 2 asociados a longitud (1c), 4 asociados a peso (1d), 1 asociado a diámetro (e) y 1 a forma (f) del fruto. Ninguno de los ocho QTLs ni en los parentales ni en la progenie F1 y F2, mostraron correlación molecular y fenotípica (Figura 4, Cuadro 1); es decir, no ofrecen información útil para su uso en la selección asistida por marcadores para las características

Allelic condition obtained with the color marker CPFC1 in F1 and F2 progeny of this research coincided with the reporting Blas *et al*. (2010), who indicate that the material SunUp color red pulp amplifies a single band and has homozygous recessive condition, while Richter and Rainbow hybrids show yellow flesh and are heterozygous condition; i.e. contain two alleles showing a double amplification bands. They also mentioned that the Kapoho material has yellow flesh color but has a dominant homozygous condition. In this regard, Rodriguez (2008) reported that the characteristic yellow-fleshed (dominant allele) predominates over the orange-red flesh, so in wild populations rarely papaya appear orange-red fruits, because this color is given by recessive genes.

The molecular marker flesh color (CPFC1) the F1 and F2 genotypes derived from the cross L7xM22 facilitated early detection of genotypes with reddish-orange pulp (phenotypically could be obtained 7-9 months after transplantation) and achieved a correlation molecular much as morphological in relation to the expected segregation ratio. So this specific marker can also have an important potential use in marker-assisted selection (SAM) for the character color of pulp, used in early in nursery plants without having to wait up to nine months to display color fruit of the genotypes used in breeding programs papaya.

QTLs associated markers fruit morphology of *Carica papaya* L.

The sizes of fragments obtained in silico with values between 84 bp to 174 bp (data not shown) it was as expected and approximate the QTLs microsatellite (SSR) amplified by PCR in parental L7, M22 and progeny F1 and F2 (Figure 4) also consistent with those reported by Mittal and Dubey (2009) who mentioned that the amplified fragments of SSR are variant size, usually several tens to several hundred base pairs (bp), codominant, polymorphic and Mendelian segregation, attributes that could be seen in this investigation.

The eight QTLs associated characters morphology fruit parental L7 and M22, are shown in Figure (1 cf) 2 associated length (1c), 4 associated with weight (1d), one associated diameter (e) and 1 to form (f) of the fruit. None of the eight QTLs or parental and F1 and F2 progeny showed molecular and phenotypic correlation (Figure 4, Table 1); i.e. not provide useful for use in marker-assisted selection

del fruto de papaya tales como longitud, peso, diámetro y forma de fruto. Es posible que la falta de correlación se deba a que esos caracteres exhiben una extensa variación a lo largo de un gradiente continuo, atribuidos a la interacción de dos o más genes (poligénicos) (Obando *et al.,* 2008). No se descarta que existan efectos pleiotrópicos sobre los QTLs asociados a la morfología del fruto de papaya, los cuales guardan estrecha relación con los genes *ovate*, *sun* y *fw.2.2* presentes en el genoma de tomate y en regiones ortólogas en el genoma de papaya (Paull *et al*., 2008; Blas *et al*., 2012).

En otras especies como tomate, se ha sugerido que factores tales como la fertilización, temperatura y humedad van a influir directamente en la expresión del gen *sun* que regula la elongación temprana del pericarpio del ovario*,* del gen *ovate* involucrado en la elongación del pericarpio del ovario después de la fertilización y del gen *fw2.2* que regula la división celular y desarrollo del fruto. Se asume que el efecto en papaya puede ser similar, de tal manera que los QTL que estén influenciados por esos genes se verán afectados, tal es caso de algunos genotipos evaluados. O bien, estos QTLs evaluados inicialmente en papaya Hawaiana, no están asociados a los caracteres morfológicos del fruto tales como longitud, peso, diámetro y forma del fruto en híbridos de Maradol x material criollo de *Carica papaya* L.

Análisis morfológico

La identificación molecular del tipo sexual coincidió con el dato fenotípico registrado y evaluado tres meses después del trasplante, tanto en los parentales como en la progenie F1 y F2 de *Carica papaya* L. (Figuras 2a y 3a). La población F1 obtenida de la cruza intraespecífica L7xM2 y la F2 proveniente de autopolinizaciones de los genotipos H90B, H77B y H70B desarrollaron solamente plantas hermafroditas y femeninas. Para la F1 los valores fueron 28 hermafroditas y 14 femeninas; lo que representa un 67% de hermafroditismo y un 33% de feminismo. Dentro de la F2 los porcentajes fueron de 64%, 72% y 67% de hermafoditismo y 36%, 28% y 33% de feminismo, para H90B, H77B y H70B, respectivamente, quienes se mantuvieron próximos a la proporción de 2:1 esperada.

De igual forma la identificación molecular del color de fruto se contrastó con la caracterización morfológica del color de los frutos efectuada entre 7 y 9 meses después, toda vez que las plantas tanto en los parentales como en la progenie F1 y F2 correspondientes emitieron frutos (Figuras 2b y 3b). De

for papaya fruit characteristics such as length, weight, diameter and shape of fruit information. It is possible that the lack of correlation is because these characters exhibit a wide variation along a continuous gradient attributed to the interaction of two or more genes (polygenic) (Obando *et al*., 2008). It is not excluded that there pleiotropic effects on QTLs associated with papaya fruit morphology, which are closely related to the genes ovate, sun and fw.2.2 present in the genome of tomato and orthologous regions in the genome of papaya (Paull *et al*., 2008; Blas *et al*., 2012.

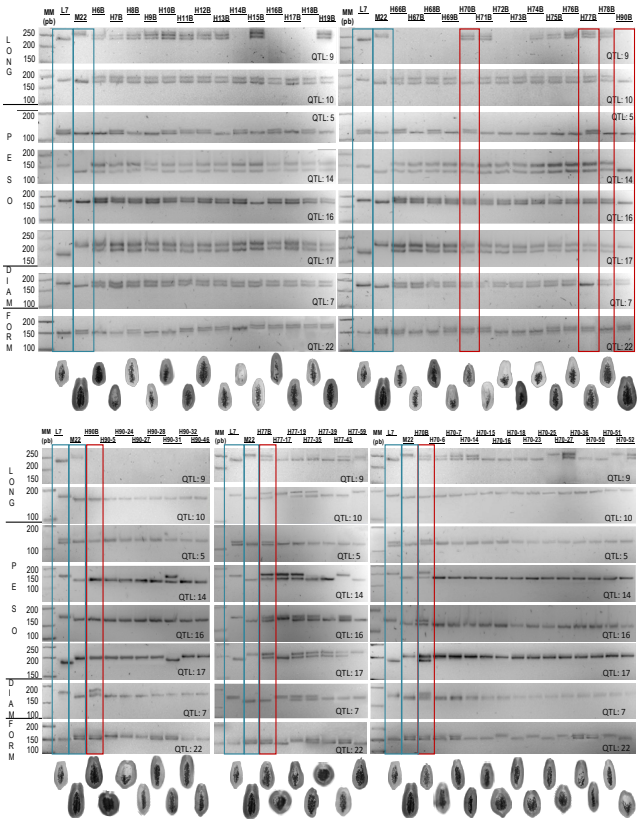

Figura 4. Electroforesis de marcadores moleculares QTLs asociados a la morfología del fruto amplificados en los parentales Criolla línea 7 y Maradol 22 de *Carica papaya* L. y su progenie F1(a) y F2 (b). Se incluye la fotografía del fruto correspondiente a cada progenie F1 y F2, obtenida a los 9 meses después de haber tomado la muestra de ADN. MM: 50 pb.

Figure 4. Electrophoresis is an of molecular markers associated with QTLs fruit morphology amplified in line 7 and Maradol 22 Criolla *Carica papaya* L. parental and progeny F1 (a) and F2 (b). The photography fruit includes corresponding each progeny F1 and F2, obtained 9 months after taking the DNA sample. MM: 50bp.

manera similar 7 y 9 meses después de tomarse las muestras para el análisis molecular de los QTLs asociados a forma de fruto, se caracterizó la variabilidad en el largo, diámetro, peso y forma de los frutos correspondientes y se presentan en la Figura 4 y en el Cuadro 1.

In other species such as tomato, it has been suggested that factors such as fertilization, temperature and humidity will directly influence the expression of the sun gene regulating early elongation pericarp ovary, ovate gene involved in elongation pericarp ovary after fertilization and *fw2.2* gene

Cuadro 1. Valores medios de caracteres morfológicos asociados al tamaño y forma del fruto de progenie F1 y F2 proveniente de la cruza intraespecífica L7xM22 de *Carica papaya* L. Forma del fruto de *Carica papaya* L. según IPBGRI. 1= globular; 2= redondo; 5= oval; 6= oblongo; 10= cilíndrico; 11= periforme; y 17= ciruela.

Table 1. Mean values associated morphological characters the size and shape of fruit progeny F1 and F2 intraspecific crosses from *Carica papaya* L. L7xM22. Shape fruits of *Carica papaya* L. according IPBGRI. 1= globular; 2= round; 5= oval; 6= oblong; 10= cylindrical; 11= periforme; and 17= plum.

Progenie F1	Longitud de fruto	Peso de fruto	Diámetro de fruto	Forma	Progenie F2	Longitud de fruto	Peso de fruto	Diámetro de fruto	Forma
L7	16.00±1.20	400.0±78.14	7.50±1.73	11			H90B		
M22	27.00±0.64	2230±42.73	13.3±0.76	10	H90-5	14.0±0.73	1057.2±73.4	13.0±1.5	5
H6B	15.63±2.00	447.8±165.2	8.17±195.4	10	H90-24	23.1±0.63	2013.2±162.2	15.1±0.91	1
H7B	18.50±1.59	827.3±211.6	10.07±0.99	11	H90-27	24.8±1.58	1637.3±77.71	12.9±1.32	17
H8B	16.57±0.49	396.0±77.58	7.27±0.83	10	H90-28	25.8±0.72	1945.6±201.6	12.4±0.76	10
H9B	16.43±0.70	539.6±94.25	9.30±0.66	11	H90-31	18.6±0.49	776.7±95.23	9.80±0.52	10
H10B	14.93±0.68	378.4±32.33	8.10±0.29	11	H90-32	24.7±0.61	1535.4±154.3	11.0±0.48	10
H11B	15.77±0.63	575.7±78.40	9.03±0.41	17	H90-46	25.1±0.79	1286.0±32.31	11.7±0.87	11
H12B	19.10±0.79	750.7±145.3	9.53±0.82	17			H77B		
H13B	16.30±0.72	495.6±95.83	8.40±0.51	11	H77-17	13.3±0.85	922.3±165.9	14.1±0.84	5
H14B	14.17±2.90	481.4±190.2	7.30±1.90	10	H77-19	17.0±0.61	679.1±128.1	11±0.29	11
H15B	18.93±1.65	710.7±150.3	9.37±1.08	17	H77-35	18.4±1.21	581.15±109.1	11.5±1.08	17
H16B	20.40±0.56	592±104.91	8.23±0.83	17	H77-39	13.0±2.60	525.9±194.7	11.0±0.53	2
H17B	20.43±1.31	792.8±128.5	9.80±0.35	17	H77-43	23.5±1.64	1427.6±118.5	12.3±1.6	17
H18B	18.37±0.37	504.5±32.94	8.17±0.52	11	H77-59	23.6±0.39	1169.5±191.1	13.6±0.54	11
H19B	19.57±0.88	956.7±207.2	10.97±1.14	10			H70B		
H66B	15.40±0.80	387.1±76.29	7.83±0.72	11	H70-6	25.3±0.84	1697.8±134.5	11.9±0.65	11
H67B	17.87±0.66	679±103.39	8.93±0.39	10	H70-7	20.4±0.69	731.7±56.92	10±0.33	11
H68B	18.40±0.51	774±59.54	9.73±0.16	17	H70-14	22.5±0.44	1610.6±105.3	13.8±0.52	17
H69B	18.17±0.64	581.4±72.05	8.57±0.57	10	H70-15	25.0±0.72	1527.0±67.40	15±0.43	10
H70B	15.03±1.94	449.2±190.8	8.00±1.15	11	H70-16	20.6±0.41	1690.8±72.12	16.3±0.78	5
H71B	17.70±0.66	563.1±80.50	9.30±0.86	17	H70-18	24.0±0.99	1288.3±109.7	11±0.50	10
H72B	20.23±0.99	868.9±81.06	11.20±0.63	11	H70-23	20.15±1.14	1829.1±80.6	15.9±1.11	6
H73B	19.57±0.84	781.9±187.6	10.00±1.40	17	H70-25	21.6±0.78	1161.7±86.01	12.0±1.3	10
H74B	15.30±0.90	461.2±141.2	8.80±0.34	11	H70-27	22.5±0.19	2522±178.99	17.7±0.46	5
H75B	15.17±0.12	394.4±101.4	7.80±1.10	17	H70-36	18.6±0.74	1407.7±142.2	17.9±0.86	11
H76B	20.20±1.04	796.6±63.93	11.00±0.30	11	H70-50	21.8±0.96	1339.9±101.2	12.2±0.75	10
H77B	15.63±0.14	581.6±82.71	9.37±0.76	10	H70-51	21.6±0.46	1533.8±93.63	14.2±0.73	17
H78B	18.50±0.66	812.7±83.92	10.20±0.50	11	H70-52	18.7±1.95	1136±82.17	13.2±0.99	5
H90B	18.95±0.75	825.5±161.4	10.40±0.98	10					

Conclusiones

El marcador CPM1815YC2 logró discriminar plantas femeninas de las hermafroditas en 42 genotipos F1 y 164 genotipos F2 proveniente de la cruza L7xM22 a nivel molecular antes del trasplante. Dicha clasificación coincidió al 100% con la efectuada en forma visual en las mismas plantas 3 meses después. Lo que comprueba que este marcador es altamente confiable y tiene gran potencial para su uso en la selección asistida por marcadores (SAM) en *Carica papaya* L. La identificación morfológica del tipo sexual en las plantas de *Carica papaya* L. provenientes de la cruza L7xM22 resultó entre un 67% a 72% de plantas hermafroditas y entre un 28.4% a 35.8% de plantas femeninas en progenie F1 y progenie F2; es decir, se obtuvo una relación aproximada de 2:1. Esto corresponde a la segregación del carácter del sexo cuando la polinización artificial es entre dos individuos hermafroditas o autopolinizados como fue el caso de los parentales L7 y M22 y los genotipos H90B, H77B y H70B.

La clasificación como frutos de pulpa naranja-rojiza tanto en parentales como en la progenie F1 y F2 de la cruza L7xM22 a nivel molecular en plantas jóvenes, coincidió al 100% con el análisis morfológico efectuado en los frutos emitidos por las mismas plantas entre 7 y 9 meses después. De manera que el marcador molecular de color de pulpa (CPFC1) presenta un alto potencial para ser usado en programas de mejoramiento genético asistido por marcadores orientado a seleccionar frutos de color rojo. Sin embargo, este marcador no permite distinguir entre frutos de color de pulpa amarillo claro, de aquellos de pulpa color naranja.

Los marcadores QTLs asociados a caracteres de peso, longitud, diámetro y forma del fruto de papaya aunque si distinguieron y mostraron condición alélica en varias de las características contrastantes de los progenitores, no fueron útiles para la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) de individuos contrastantes en esos caracteres dentro de la progenie F1 y F2 de híbridos provenientes de la cruza intra-específica L7xM22. investigaciones posteriores serán necesarias para desarrollar QTLs (u otros marcadores moleculares) mejor relacionados al tamaño y forma de frutos de papaya de híbridos entre Maradol x material criollo. Sin embargo, no se descarta que los QTLs aquí probados puedan distinguir forma de fruto en otros materiales de *Carica papaya* L.

that regulates cell division and fruit development. It is assumed that the effect may be similar papaya, so that the QTL that are influenced by these genes will be affected, such is the case of some genotypes. Or, these QTLs initially evaluated in Hawaiian papaya, are not associated with morphological characteristics of the fruit such as length, weight, diameter and shape of the fruit in hybrids Maradol x creole material *Carica papaya* L.

Morphological analysis

The molecular identification of sexual coincided with phenotypic data recorded and evaluated three months after transplantation, both parental and F1 and F2 of *Carica papaya* L. (Figures 2a and 3a) progeny. The F1 population obtained from intraspecific crosses L7xM2 and F2 from self-pollinations of H90B, H77B and H70B genotypes developed only hermaphrodite and female plants. For F1 values were 28 hermaphrodites and 14 female; it is representing 67% of hermaphroditism and 33% of feminism. Within the F2 percentages were 64%, 72% and 67% of hermaphroditism and 36%, 28% and 33% of feminism, for H90B, H77B and H70B, respectively, who remained close to the ratio of 2:1 expected.

Similarly the molecular identification of fruit color was compared with the morphological characterization of the color of the fruits made between 7 and 9 months later, since the plants in both parental and progeny F1 and F2 corresponding issued fruits (Figures 2b and 3b). Similarly 7 and 9 months after taking samples for molecular analysis of QTLs associated with fruit shape, variability in the length, diameter, weight and shape of the corresponding fruits it was characterized and shown in Figure 4 and in Table 1.

Conclusions

The marker CPM1815YC2 discriminating marker female plants hermaphroditic in 42 genotypes F1 and F2 genotypes 164 from mattings L7xM22 molecular level before transplantation. This classification coincided 100% with visually made in the same plants 3 months later. Proving that this marker is highly reliable and has great potential for use in marker-assisted selection (SAM) in *Carica papaya* L. Morphological sexual identification in plants *Carica papaya* L. from crossbreeding resulted L7xM22 between

Agradecimientos

Al MC Francisco Espadas y Gil y al Ing. Fernando A. Contreras Martín por su valiosa aportación del material biológico usado en esta tesis. Al Dr. Jorge Humberto Ramírez, por sus aportaciones en los análisis bioinformáticos.

Literatura citada

Alonso, E. M.; Tornet, Q. Y.; Ramos, R. R.; Farrés, A. E.; Aranguren, G. M. y Rodríguez, M. D. 2008. Caracterización y evaluación de dos híbridos de papaya en Cuba. Agric. Téc. Méx. 34(3):333-339.

Asudi, G. O.; Ombwara, F. K.; Rimberia, F. K.; Nyende, A. B.; Ateka, E. M.; Wamocho, L. S.; Shitanda, D. and Onyango, A. 2010. Morphological diversity of Kenia papaya germplasm. Afr. J. Biotechnol. 9(51):8754-8762.

Blas, A. L. 2008. Molecular genetic basis of papaya fruit traits. Tesis de doctorado. University of Hawaii. Hawaii, USA. 185 p.

Blas, A. L.; Yu, Q.; Veatch, O. J.; Robert, V.; Paull, H. M. and Ming, R. 2012. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. Mol. Breed. 29(2):457-466.

Blas, A.; Ming, R.; Liu, Z.; Veatch, O. J.; Robert, E.; Paull, H. and Qingyi, Y. 2010. Cloning of the papaya chromoplast-specific lycopene β-Cyclase, controlling fruit flesh color reveals conserved microsynteny and a recombination Hot Spot. Plant Physiol. 152(4):2013-2022.

Chaves, B. G. and Nuñez, V. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombia genotypes of *Carica papaya* L. Euphytica 153(1):215-220.

Chen, C.; Yu, Q.; Hou, S.; Li, Y.; Eustice, M.; Skelton, R. L.; Veatch, O.; Herdes, R. E.; Diebold, L.; Saw, J.; Feng, Y.; Qian, W.; Bynum, L.; Wang, L.; Moore, P. H.; Paull, R. E.; Alam, M. and Ming, R. 2007. Construction of a sequence tagged high density genetic map of papaya for comparatative structural and evolutionary genomics in brassicales. Genetics. 177(4):2481-2491.

Cituk-Chan D. E. 2006. Paquete tecnológico de producción de papaya *Carica papaya* L. Instituto Tecnológico de Conkal. 62 pp.

Demey, J. R.; Zambrano, Y. A.; Fuenmayor, F. y Segovia, V. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica de una colección de yuca. Interciencia. 28(12):684-689.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.

Esquivel, M.; Tornet, Y.; Ramos, R. E.; Farrés, E.; Castro, J. y Rodríguez, M. C. 2008. Evaluación de tres cultivares de papaya del grupo 'SOLO' basada en caracteres de crecimiento y productividad. Cultivos Tropicales. 29(2):59-64.

Ferraguetti, G. A. 2003. Caliman 01- O primeio híbrido de mamão mamão Formosa Brasileiro. *In*: Martins, D. S. (ed.). Papaya Brasil: qualidade do mamão para mercado interno. Incaper. Vitoria, ES. 211-218 pp.

Fuentes, G. and Santamaría, J. M. 2014. Chapter 1: Papaya (*Carica papaya* L.): origin, domestication, and production. Genetics and genomics of papaya. Plant genetics and genomics: crops and models. Spinger. 10: 3-15.

67% to 72% of hermaphrodite plants and between 28.4% to 35.8% of female progeny plants in F1 and F2 progeny; 1: that is, an approximate ratio of 2 was obtained. This corresponds to segregation of character sex when artificial pollination is between two individual's hermaphrodites or self-pollinated as was the case with the L7 and M22 parental and H90B, H77B and H70B genotypes.

The classification as fruit pulp orange-red in both parental and progeny F1 and F2 from the cross L7xM22 at the molecular level in young plants coincided 100% with the morphological analysis in the fruits issued by the same plants between 7 and 9 months after. So the molecular marker pulp color (CPFC1) has a high potential for use in breeding programs assisted by select fruit oriented red markers. However, this marker does not distinguish between colored fruits light yellow pulp, pulp of those orange.

The QTLs associated markers character weight, length, diameter and shape of the papaya fruit even if they could make and showed allelic condition in several of the contrasting characteristics of the parents, were not useful for assisted selection by molecular markers (SAM) of individuals in such contrasting characters in F1 and F2 progeny of hybrids from the intra-specific crosses L7xM22. further research is needed to develop better related to the size and shape of fruits of papaya hybrid between Maradol x creole materials QTLs (or other molecular markers). However, it is possible that the QTLs tested here can distinguish fruit shape in other materials *Carica papaya* L.

End of the English version

Giovannucci, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature. Journal of the National. Cancer Institute. 91(4):317-331.

IBPGR. 1988. Descriptors for papaya. Bio. Int. Roma, Italia. 34 pp.

Jimenez, V. M.; Mora, N. E. and Gutierrez, S. M. V. 2014. Plant genetics and genomics, genetics and genomics of papaya: chapter 2: biology of the papaya plant. Crops and Models. Spinger. 10:17-33.

Kanchana-udomkan, C.; Ford, R. and Drew, R. 2014. Plant Genetics and Genomics, Genetics and genomics of papaya, chapter 19: molecular markers in papaya. Crops and Models. Spinger. 10:355-375.

Lemos, E. G. M.; Silva, C. L. S. P. and Zaidan, H. A. 2002. Identifacation of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. Euphytica. 127(2):179-184.

Magdalita, P. M. and Mercado, Ch. P. 2003. Determining the sex of papaya for improved production. Food and fertilizer technology center. FFTC publication database, extension bulletins 534. University of the Philippines at Los Banos College. Laguna, Philippines. 6 p.

Manica, I. 1996. Cultivares e melhoramento do mamoeiro. *In*: Mendes, L. G.; Dantas, J. L. L.; Morales, C. F. G. Mamão no Brasil. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, Brazil. 121-143 pp.

Ming, R.; Yu, Q. and Moore, P. H. 2007. Sex determination in papaya. Seminers in cell and developmental biology. 18(3):401-408.

Mittal, N. and Dubey, A. K. 2009. Microsatellite markers- a new practice of DNA based markers in molecular genetics. Pharmacognosy Reviews. 3(6):235-246.

Muñozcano, R. M. y Martínez, A. C. O. 2009. Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa A.C. Sinaloa, Mexico. 37 p.

Nagata, M. and Yamashita I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoides in tomato fruit. J. Japanese Soc. Food Sci. Technol. 39(10):925-928.

Niroshini, E. J.; Everard, M. D. T.; Karunanayake; E. H. and Tirimanne, T. L. S. 2008. Detection of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to sex expression in *Carica papaya* L. J. Nat. Sci. Foundation Sri Lanka. 36(2):145-150.

Obando, J.; Fernández, T. J. P.; Martínez, J. A.; Alarcón, A. L.; Eduardo, I.; Arús, P. and Monforte, A. J. 2008. Identification of melon fruit quality quantitative trait loci using near-isogenic lines. J. Am. Soc. Hort. Sci. 133(1):139-151.

OECD. 2005. Consensus document on the biology of papaya (*Carica Papaya* L.). ECD environment, health and safety publications series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology no. 33. Paris. 66 p.

Olmos, S. 2004. Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. Agrotecnia. 12:23-31.

Paull, R. E.; Irikura, B.; Wu, P.; Turano, H.; Chen, N. J.; Blas, A.; Fellman, J. K.; Gschwend, A. R.; Wai, C. M.; Yu, Q.; Presting, G.; Alam, M. and Ming, R. 2008. Fruit development, ripening and quality related genes in the papaya genome. Tropical Plant Biol. 1(3-4):246-277.

Posada, P. L.; Gómez, K. R.; Pérez, P. J.; Reyes, V. M. and Norman, M. O. 2010. Development of a new papaya (*Carica papaya* L.) hybrid IBP 42-99. Interciencia. 35(6):461-465.

Reddy, S. R.; Balamurali, K. R. and Jagadeeswara, R. K. 2012. Sex determination of Papaya (*Carica papaya*) at seedling stage through RAPD markers. Res. Biotechnol. 3(1):21:28.

Rodríguez, M. A. 2008. De la ciencia popular a la industria: la variedad cubana de papaya "Maradol". Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). La Habana, Cuba. 23 p.

Samson, J. A. 1986. Mango, avocado and papaya. *In*: tropical fruits. JA Samson (Ed). Longman Scientific Inc. New York. 185-221 pp.

Sánchez-Betancourt, S. E. y Nuñez, Z. V. M. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). Rev. Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 9(2):31-36.

Santamaría, B. F.; Sauri, D. E.; Espadas, Gil, F.; Díaz, P. R.; Larqué, S. A. and Santamaría, F. J. 2009. Postharvest ripening and maturity indices for Maradol papaya. Interciencia. 34(8):583-588.

Santiago, S. P. y Ramírez, P. J. H. 2012. prfectBLAST: a platform-independent portable front end for the command terminal BLAST+ stand-alone suite. BioTechniques. 53(5):299-300.

Somsri, S. and Bussabakornkul, S. 2008. Identification of certain papaya cultivars and sex identification in papaya by DNA amplification fingerprinting (DAF). Acta Hortic. 787:197-206.

UPOV. 2010. International union for the protection of new varieties of plants. Papaya UPOV Code: Caric_pap *Carica papaya* L. 32 p.

Urasaki, N.; Tarora, K.; Uehara, T.; Chinen, I.; Terauchi, R. and Tokumoto, K. 2002. Rapid and highly reliable sex diagnostic PCR assay for papaya (*Carica papaya* L.). Breed. Sci. 52(4):333-335.

Valadez, M. E. y Günter, K. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa México. D. F., México. 60 p.

Yamamoto, H. Y. 1964. Comparison of the carotenoids in yellow-and red-fleshed *Carica papaya*. Nature 201:1049-1050.