

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación  
**Optimización de protocolo para extracción de ADN y perfil térmico  
para marcador molecular tipo SCAR T1 en cultivo de papaya *Carica  
papaya L.***

Estudiante

Juan Daniel Rojas Ordóñez

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Iveth Rodríguez, M.Sc.

Honduras, junio 2022

**Autoridades**

**TANYA MÜLLER GARCÍA**

Rectora

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

## Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras .....	6
Resumen .....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos.....	12
Optimización de Protocolo para Extracción de ADN de Papaya.....	12
Rompimiento del Tejido Celular .....	12
Rompimiento de la Membrana.....	13
Purificación del ADN .....	14
Colecta del Material Vegetal.....	15
Cuantificación de ADN .....	16
Diluciones.....	17
Evaluación de Calidad de ADN .....	17
Optimización de Protocolo para Marcador Molecular T1 Mediante PCR Convencional.....	18
Electroforesis .....	19
Optimización del Protocolo de ADN de Papaya.....	20
Evaluación de Calidad de ADN de Papaya .....	20
Gradiente de Temperatura en Termociclador para Prueba PCR .....	22
Amplificación .....	23

Conclusiones .....	25
Recomendaciones .....	26
Referencias.....	27

## Índice de Cuadros

Cuadro 2 Secuencia de bases nitrogenadas del marcador molecular T1 de avance y reversa .....	18
Cuadro 3 Mezcla maestra utilizada en prueba PCR para amplificar ADN de papaya .....	18
Cuadro 4 Programación de fases en el termociclador para amplificación de ADN de papaya con marcador tipo SCAR T1. ....	19
Cuadro 5 Diluciones de ADN de papaya y buffer para su estandarización.....	21
Cuadro 6 Gradiente de temperatura utilizado para PCR para amplificación de ADN de papaya.....	23

## Índice de Figuras

Figura 1 Muestra macerada de tejido joven de papaya .....	12
Figura 2 Baño en seco de las muestras de papaya .....	13
Figura 3 Tubos con el pellet de ADN de papaya .....	14
Figura 4 Material Vegetal e identificación .....	15
Figura 5 Flores de papaya .....	16
Figura 6 Fluorómetro .....	17
Figura 7 Electroforesis.....	19
Figura 8 Evaluación de calidad de ADN de papaya .....	21
Figura 9 Amplificación y gradiente de temperatura para amplificación de ADN de papaya.....	23
Figura 10 Amplificación del ADN de papaya con cebador T1 .....	24

## Resumen

La papaya *Carica papaya* L. es nativa del trópico americano y es la tercera fruta tropical de mayor consumo a nivel mundial representando una gran importancia desde el punto de vista económico y social. Es una especie trioica, para los productores es necesario la detección temprana del sexo de las plántulas para llevar a campo definitivo solo las hermafroditas. Los objetivos de este estudio fueron optimizar el protocolo de extracción de ADN y el perfil térmico del cebador T1 en el cultivo de papaya. Para llevar a cabo este estudio fue necesario determinar la cantidad de tejido a utilizar y la calidad del ADN mediante la optimización del protocolo de extracción de ADN para frijol *Phaseolus vulgaris* L. y se optimizó el perfil térmico del cebador T1 estableciendo diferentes gradientes de temperatura en el termociclador específicamente para la fase de hibridación (59.9 °C, 60°C y 60.1°C). La cantidad de tejido optima que se debe utilizar es de 1 cm<sup>2</sup> y se debe agregar un lavado adicional con alcohol al 70% para obtener ADN de calidad y alta concentración (>30 ng/μl). La temperatura de hibridación del cebador T1 fue de 60 °C amplificando tanto en las muestras de las plantas con flores hermafroditas, macho y femeninas a 1300 pb. Se optimizó el protocolo de ADN para cultivo de papaya con altas concentraciones y de buena calidad y se optimizó el perfil térmico del cebador T1 el cual amplificó en muestras de ADN proveniente de plantas con flores hermafroditas, machos y hembras.

*Palabras clave:* Calidad de ADN, cebador, gradientes de temperatura, hibridación, trioica.

## Abstract

Papaya *Carica papaya* L. is native to the American tropics and is the third most consumed tropical fruit worldwide, representing great importance from an economic and social point of view. It is a trioecious species, for the producers it is necessary to detect early the sex of the seedlings to take only the hermaphrodites to the definitive field. The objectives of this study were to optimize the DNA extraction protocol and the thermal profile of the T1 primer in the papaya crop. To carry out this study it was necessary to determine the amount of tissue to be used and the quality of the DNA by optimizing the DNA extraction protocol for beans *Phaseolus vulgaris* L. and optimizing the thermal profile of the T1 primer by establishing different temperature gradients in the thermocycler specifically for the hybridization phase (59.9 °C, 60 °C and 60.1 °C). The optimal amount of tissue to use is 1 cm<sup>2</sup> and an additional wash with 70% alcohol should be added to obtain quality, high-concentration DNA (>30 ng/μl). The annealing temperature of the T1 primer was 60 °C, amplifying both in the samples of the plants with hermaphrodite, male and female flowers at 1300 bp. The DNA protocol for papaya cultivation with high concentrations and good quality was optimized and the thermal profile of the T1 primer was optimized, which amplified in DNA samples from plants with hermaphroditic, male, and female flowers.

*Keywords:* DNA quality, hybridization, primer, temperature gradients, trioica.

## Introducción

La papaya (*Carica papaya L.*), pertenece a la familia Caricaceae, es nativa del trópico americano y es la especie más importante del género *Carica* por su alto valor nutritivo e industrial (Rodríguez Cabello et al. 2014). Distribuida en todos los países tropicales y subtropicales del mundo, la papaya es la tercera fruta tropical más consumida en el mundo y, por lo tanto, una de las más importantes desde el punto de vista económico y social al ser una fuente de ingresos para miles de familias y, al mismo tiempo, medio de captación de divisas para los países (Valencia Sandoval et al. 2017).

La papaya es una especie polígama (trioica) esto quiere decir que presenta plantas con tres tipos sexuales bien diferenciados que son: femenino, masculino y hermafrodita. Las plantas hermafroditas presentan flores bisexuales con estambres y pistilo, las plantas masculinas presentan flores estaminadas, con estambre y un pistilo rudimentario, que escasamente da frutos de valor comercial. El sexo de papaya está controlado por un par de cromosomas sexuales. Existe un locus genético con tres alelos: M (macho), M<sup>h</sup> (hermafrodita) y m (hembra). Los alelos M y M<sup>h</sup> serían dominantes sobre el m. Las hembras mm son homocigóticas recesivas. Los machos (Mm) y las hermafroditas (M<sup>h</sup>m) serían heterocigóticos. Las características hermafroditas y masculinas determinadas por dos cromosomas Y ligeramente diferentes, Y e Y<sup>h</sup> (alelos M y M<sup>h</sup>), respectivamente. El genotipo XX (mm) determina el sexo femenino, XY (mM) determina el sexo masculino y XY<sup>h</sup> (mM<sup>h</sup>) determina el sexo hermafrodita (IVAMI 2017).

Comercialmente, los papayeros cuentan con plantas femeninas y hermafroditas. Las primeras producen un fruto menos carnoso y más pequeño en comparación con las segundas, por lo que siempre se busca sembrar hermafroditas. Sin embargo, el productor no puede determinar si una plántula es femenina o hermafrodita basándose en características como el color o forma de la semilla, hoja o tallo. Entonces, tradicionalmente, se ha visto obligado a utilizar un número mayor de semillas para asegurar un alto porcentaje de plantas hermafroditas. De hecho, el agricultor debe esperar entre ocho a doce semanas para que la planta florezca y a partir de la observación de la flor, saber si es

femenina o hermafrodita. No obstante, para ese momento, el productor ya ha invertido en mano de obra, tiempo y manejo sanitario y agronómico en plantas femeninas que no le serán rentables (Soto 2017).

A nivel comercial, los productores de papaya prefieren las plantas hermafroditas por que los frutos de estas plantas tienen forma alargada, lo que favorece su comercialización al requerir contenedores de menor volumen, además, presentan una menor cavidad donde se localizan las semillas, por tanto mayor relación pulpa cavidad en comparación con los frutos de plantas femeninas y mayor firmeza, que contribuye a menores daños poscosecha (Mora y Bogantes, Arias 2013). El sexo de las plantas de papaya es determinado, por métodos convencionales, hasta que las plantas llegan a floración entre dos a tres meses después de la siembra (Aspeitia Echegaray 2012). Los productores determinan el sexo de las plantas y eliminan las femeninas, de manera que permanezcan solo las hermafroditas en el campo. Este sistema es poco eficiente en el uso del tiempo, material de siembra (plántulas), mano de obra y nutrimentos, al descartar un número considerable de plantas al momento del sexado. Y dejar una planta hermafrodita por postura de siembra (Barrantes Santamaría et al. 2019).

Actualmente, es posible determinar el sexo de las plantas de papaya en estado de plántula mediante marcadores moleculares (Barrantes Santamaría et al. 2019). El sistema de sexado molecular consiste en determinar el sexo en almácigo o plántulas a temprana edad mediante el análisis genético de tejido vegetal y luego establecer una planta hermafrodita por postura de siembra (Barrantes Santamaría et al. 2019).

Para el sexado de plantas de papaya se han utilizado marcadores SCAR (Región amplificada de secuencia caracterizada). Este tipo de marcador consiste en un fragmento de ADN genómico amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un par de iniciadores específicos. Una de sus ventajas sobre los marcadores RAPD es que detectan un locus específico (Semagn et al. 2006). Deputy et al. (2002) desarrollaron los marcadores SCAR denominados T1, T12 y W11. Según Aspeitia Echegaray (2012) los marcadores T12 y W11 amplifican fragmentos de aproximadamente 800

pb en las plantas hermafroditas en comparación con el marcador T1 que genera los fragmentos son de aproximadamente 1300 pb.

Los avances de la biología molecular han hecho posible la determinación temprana y rápida del sexo de las plántulas de papaya, mediante marcadores moleculares y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Barrantes Santamaría et al. 2019). Las ventajas de la caracterización usando marcadores moleculares se debe a que no influyen condiciones ambientales y se puede usar cualquier parte de la planta no importando el estado de desarrollo que se encuentre, estos funcionan como señaladores de diferentes partes del genoma y unas de sus características son: fenotípicamente neutros, permite la correcta identificación del material vegetativo y se puede evaluar desde los primeros estados de desarrollo de la planta (Tanksley 1983).

Para terminar, los objetivos del presente estudio fueron optimizar el protocolo de extracción de ADN para cultivo de papaya y optimizar el perfil térmico para el marcador molecular T1 en el cultivo de papaya.

## Materiales y Métodos

### Optimización de Protocolo para Extracción de ADN de Papaya

Para optimizar el protocolo de extracción de ADN de papaya se procedió a cosechar tejido vegetal joven de 10 plantas de papaya híbrido Bela Nova F1 y se utilizó el método de extracción de ADN para frijol de Skroch et al. (1998) optimizado para las condiciones del laboratorio de Biotecnología Aplicada de la UIDC. Para estandarizar la cantidad óptima del material vegetal se colectó tejido joven de 20 plantas y se utilizó 0.5 cm<sup>2</sup> de material vegetal en 10 muestras y 1 cm<sup>2</sup> de material vegetal en las 10 muestras restantes.

### Rompimiento del Tejido Celular

Para realizar la extracción de ADN se tomó tejido de cada hoja seleccionada y fueron introducidos en tubos Eppendorf de 1.5 mL para microcentrifuga, se colocó en cada tubo un balín y 100 µL de buffer de extracción (PEX), se realizó la maceración durante dos ciclos de 30 segundos cada uno en un disruptor de tejidos BEAD RUPTOR (OMNI Inc) para luego colocar 400 µL de buffer de extracción (PEX) y agitar los tubos en el Vortex-Genie™ 2 (Figura 1).

### Figura 1

*Muestra macerada de tejido joven de papaya*



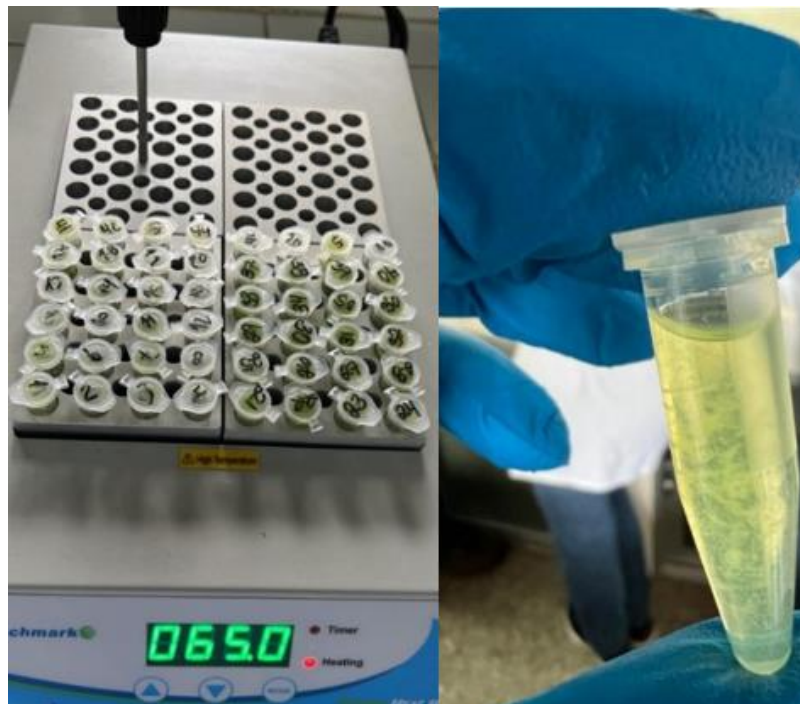
*Nota.* Muestra de tejido vegetal tras ser macera en el disruptor de tejidos.

## Rompimiento de la Membrana

Se colocaron las muestras en un baño seco digital BSH100 series BENCHMARK SCIENTIFIC a 65 °C por 1 hora (Figura 2). Se centrifugaron las muestras en Centrífuga 5424 con rotor modelo FA-45-24-11 Eppendorf™, durante 10 minutos a 14000 RPM, se transfirió el sobrenadante a otros tubos limpios Eppendorf de 1.5 mL. Se colocó 1 mL de mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio a cada muestra y se mezcló con el uso del Vortex-Genie™ 2, luego se dejó precipitar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se agitaron manualmente para romper el precipitado y las muestras se colocaron en la centrífuga para precipitar los ácidos nucleicos a 3000 RPM por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó a los tubos con los pellets 300 µL de ARNasa a una concentración de 100 µg/ml + buffer TE 0.1X. Las muestras se agitaron en el Vortex-Genie™ 2 e incubaron en baño seco digital a 37 °C por 1 hora, luego se centrifugaron a 14000 RPM por 3 minutos; El sobrenadante (ADN) se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio.

### Figura 2

*Baño en seco de las muestras de papaya*



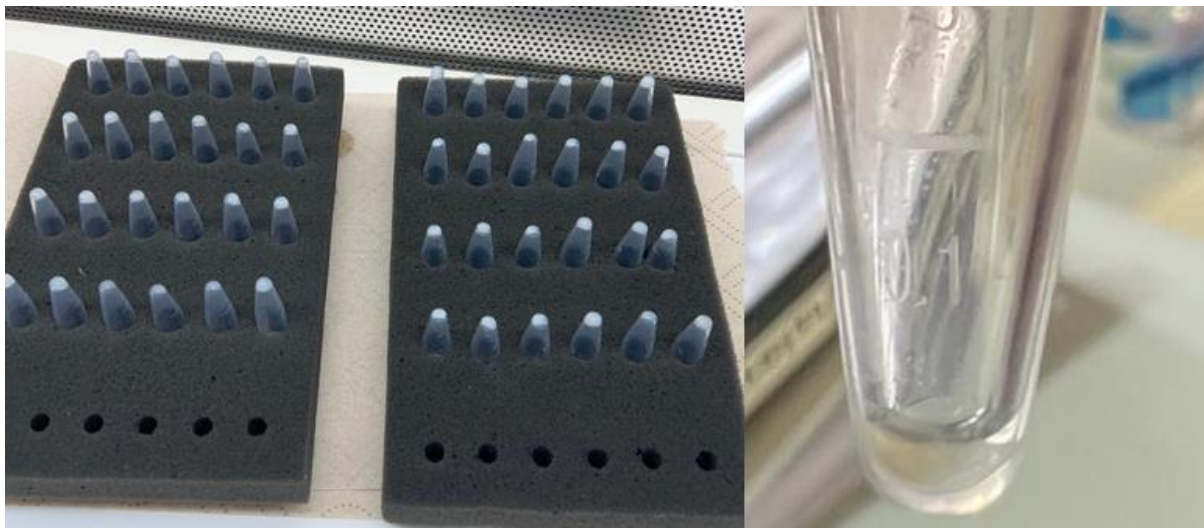
*Nota.* izquierda. Muestras en baño maría en seco a 65 °C por una hora. Derecha. Tubo de 1.5 ml con mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio.

## Purificación del ADN

El ADN se precipitó colocando en los tubos 1 mL de mezcla de 10:1 de etanol:acetato de sodio. Los tubos se invirtieron manualmente para que el ADN se precipitara a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 25 minutos. Los tubos se agitaron manualmente y centrifugaron por 5 minutos a 3000 RPM para precipitar el ADN. Se vació el etanol:acetato de sodio y lavaron los pellets colocando 1 mL de etanol al 70% y se agitó con ayuda del Vortex-Genie™ 2, luego se centrifugaron por 30 segundos a 14000 RPM y se vació el etanol. Adicional al protocolo optimizado del laboratorio de UIDC se realizó un doble lavado a las muestras con etanol al 70% y se volvió a centrifugar durante 30 segundos a 14000 RPM, finalmente se volvió a vaciar el etanol para que solo quedara el pellet en el tubo, estos fueron invertidos y se dejaron a temperatura ambiente hasta el día siguiente (Figura 3). Se realizó la rehidratación de cada muestra de ADN agregando 100  $\mu$ L de buffer TE 0.1X y para ayudar a disolverlo los tubos se colocaron en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.

### Figura 3

*Tubos con el pellet de ADN de papaya*



*Nota.* izquierda. muestras con el pellet de ADN de papaya invertidos. Derecha. Tubo con el pellet de ADN de papaya

## **Colecta del Material Vegetal**

Al finalizar con la optimización del protocolo de extracción de ADN para papaya se realizó la cosecha de hojas jóvenes de acuerdo con el tipo sexual de flores de la planta (Figura 4). Para este estudio se seleccionaron 40 plantas en producción de papaya híbrido Bela Nova F1, de las cuales 20 plantas con flores hermafroditas y macho y 20 plantas con flores femeninas. Se colectaron flores hembra, macho y hermafroditas, además de hojas jóvenes (Figura 5) de cada planta seleccionada. Bela nova F1, es un híbrido de papaya con plantas bajas con alto cuaje. Frutas (1-1.5kg) uniformes en tamaño y forma. La carne es firme, gruesa y tiene un sabor muy dulce (Brix:12-13). Este Híbrido es tolerante al virus mancha anular de la papaya (East-West Seed 2022).

El tejido vegetal (flores y hojas) fue colocado dentro una bolsa de papel manila y fue identificada para posteriormente ser trasladado al laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Cultivos (UIDC) de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano y utilizar el protocolo de ADN optimizado.

### **Figura 4**

#### *Material Vegetal e identificación*



*Nota.* izquierda. material colectado de las hojas más jóvenes. derecha. identificación de las muestras

## Figura 5

### *Flores de papaya*



*Nota.* de izquierda a derecha: flor femenina, hermafrodita y masculina de papaya.

### **Cuantificación de ADN**

Para la cuantificación de ADN se utilizó el Fluorómetro compacto Quantus™ de Promega (Figura 6). Lo primero que se hace es la calibración del equipo, para el uso del fluorómetro es necesario el uso de tubos especiales del equipo, a los cuales se les agregó 199  $\mu\text{L}$  de Quantiflour® dsnDNA System que es un tinte de ADN y 1  $\mu\text{L}$  de ADN de la muestra a cuantificar, al tener todas las muestras con el tinte y ADN se colocaron en la oscuridad por 5 minutos para luego realizar la cuantificación de las muestras. Se tomaron los tubos individualmente y se colocaron en el fluorómetro y este nos da la concentración en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de ADN.

**Figura 6**

*Fluorómetro*



*Nota.* Fluorómetro indicando que la muestra de ADN era demasiado baja para poder ser leída.

### **Diluciones**

Esto consiste en estandarizar las muestras a una misma concentración de ADN, en este caso se estandarizó a 30 ng/μL en 100 μL de solución final. Para calcular la cantidad de ADN a usar en cada dilución se aplicó la siguiente formula:

$$VI = \frac{CF * VF}{CI} \quad [1]$$

### **Evaluación de Calidad de ADN**

Se preparó el gel de agarosa al 1.5% el cual se disolvió en 100 mL de Buffer TBE 1X, la solución se introduce al microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente, se sacó del microondas y se esperó que la temperatura baje a 60 °C para colocar el tinte Safe DNA gel stain Green de SYBR® en la solución a razón de 1 μL por cada 10 μL de solución de agarosa. Se colocó la solución en la bandeja durante 20 minutos hasta que se gelificó. Al completarse el tiempo el gel se colocó en el tanque de la

electroforesis, luego con el uso de una micropipeta se mezcló 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga Blue/Orange 6x Loading Dye de Promega con el ADN de las muestras en cada uno de los orificios hechos por el peine. Cuando se colocaron todas las muestras, se inició el corrido electroforético durante una hora y media a 100 voltios, al finalizar el tiempo en la electroforesis el gel es trasladado al transiluminador para determinar si la calidad del ADN era óptima para realizar la prueba PCR.

### **Optimización de Protocolo para Marcador Molecular T1 Mediante PCR Convencional**

Para la reacción de amplificación de ADN mediante PCR se hidrató el marcador molecular T1 (Cuadro 1) con agua libre de nucleasas. Para realizar la mezcla maestra se combinaron varios reactivos (Cuadro 2). Por muestra se colocó 23  $\mu\text{L}$  de mezcla maestra y se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de ADN, al tener listas las muestras se colocó una gota de aceite mineral a cada una para evitar que se evaporaran. Se preparó el protocolo para realizar la prueba PCR en el termociclador y se procedió a optimizar el perfil térmico, específicamente la temperatura de hibridación del primer; Para ello se procedió a programar el gradiente de temperatura en el termociclador, donde se evaluaron 32 muestras utilizando 3 temperaturas las cuales fueron las siguientes: 8 muestras a 59.9 °C, 10 a 60 °C y 14 a 60.1 °C. utilizando 45 ciclos con los tiempos y temperaturas (Cuadro 3).

#### **Cuadro 1**

*Secuencia de bases nitrogenadas del marcador molecular T1 de avance y reversa*

Clave	Iniciador
T1-F	5'-TGCTCTTGATATGCTCTCTG-3'
T1-R	5'-TACCTTCGCTCACCTCTGCA-3'

#### **Cuadro 2**

*Mezcla maestra utilizada en prueba PCR para amplificar ADN de papaya*

Reactivos	$\mu\text{L}/$ muestra
Agua	13.5
Buffer PCR	5
MgCl <sub>2</sub>	2.5
DNTPs	0.5

Reactivos	μL/ muestra
Primer F	0.5
Primer R	0.5
Taq Polimerasa	0.5
Total	23

### Cuadro 3

*Programación de fases en el termociclador para amplificación de ADN de papaya con marcador tipo SCAR T1.*

Fase	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	2 minutos	95
Desnaturalización	15 segundos	95
Hibridación	15 segundos	--
Extensión	45 segundos	72
Extensión final	5 minutos	72
Mantenimiento	-----	10

### Electroforesis

Para la electroforesis se utilizó gel agarosa al 1.2 % en buffer TBE 1X con tinte Safe DNA gel stain SYBR®, al tener preparado el gel se colocó en el tanque de electroforesis y se colocó 15 μL de las muestras en los orificios del gel, se programó por una hora y media a 100 voltios (Figura 7).

### Figura 7

*Electroforesis*



*Nota.* izquierda. proceso de inyectar las muestras de mezcla maestra y ADN en los agujeros del gel. medio. gel listo para realizar la electroforesis. Derecha. Regulador de voltaje.

## **Resultados y Discusión**

### **Optimización del Protocolo de ADN de Papaya**

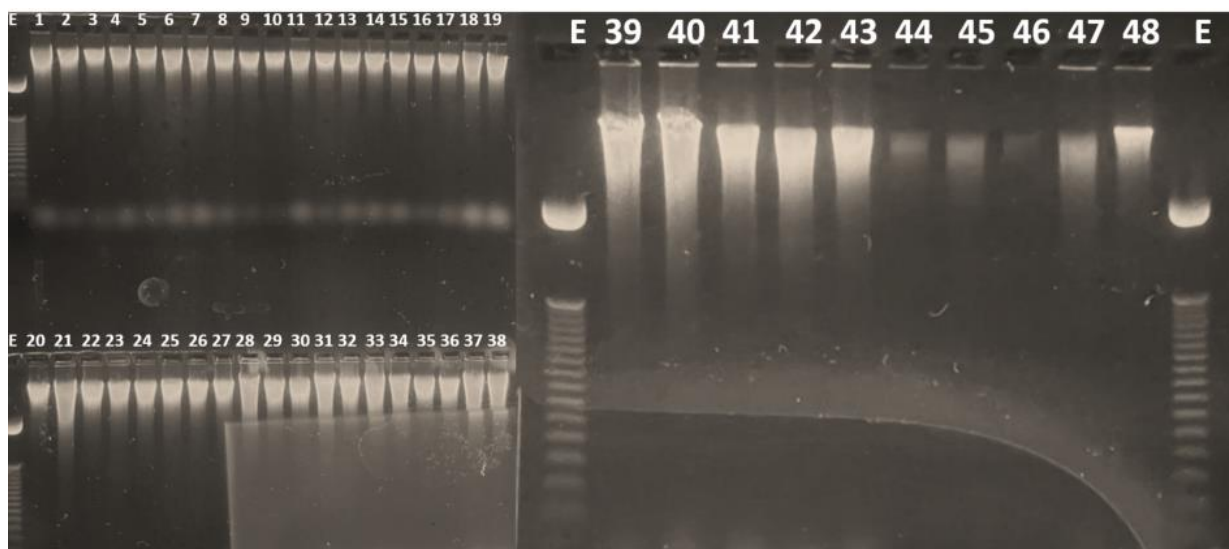
La cantidad de tejido para extracción de ADN se optimizó utilizando tejido de hojas jóvenes 1 x 1 cm al igual que Saalau-Rojas et al. (2009) quienes utilizaron secciones de hoja de 1 cm<sup>2</sup> de tamaño. Fue necesario agregarle un paso adicional de lavado con etanol al 70% para obtener una muestra más limpia y pura. Para determinar la calidad del ADN se realizó gel de agarosa al 1.5% y se cuantificó el ADN utilizando el ADN puro.

### **Evaluación de Calidad de ADN de Papaya**

Al finalizar la electroforesis los gels de agarosa fueron trasladados al transiluminador y se observó el corrido electroforético del ADN, para verificar la integridad de cada muestra a utilizar durante la PCR (Figura 8), según Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN (2020) La electroforesis en gel de agarosa permite la valoración de la integridad de la muestra de ADN. Se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa se corresponde a una banda discreta. Adicionalmente cada muestra se cuantificó para conocer la cantidad de ADN por muestra y proceder a realizar las diluciones para estandarizar las muestras a 30 ng/μl. En el Cuadro 4 indica la concentración inicial (CI), concentración final (CF) y el volumen inicial que es el ADN y la cantidad de buffer que se agregó por muestra para estandarizar todas las muestras a 30 ng/μL.

## Figura 8

### Evaluación de calidad de ADN de papaya



Nota. E: escalera molecular, 1-20: bandas amplificadas provenientes de ADN de plantas de papaya femeninas. 21-40: bandas amplificadas provenientes de ADN de plantas de papaya hermafroditas. 41-48: bandas amplificadas provenientes de ADN de flores de papaya.

## Cuadro 4

### Diluciones de ADN de papaya y buffer para su estandarización

No.	C.I.	C.F.	V.I. (ADN)	V.F.	BUFFER
1	195	30	15.4	100	84.6
2	179	30	16.8	100	83.2
3	187	30	16.0	100	84.0
4	186	30	16.1	100	83.9
5	180	30	16.7	100	83.3
6	194	30	15.5	100	84.5
7	182	30	16.5	100	83.5
8	181	30	16.6	100	83.4
9	164	30	18.3	100	81.7
10	161	30	18.6	100	81.4
11	181	30	16.6	100	83.4
12	170	30	17.6	100	82.4
13	172	30	17.4	100	82.6
14	181	30	16.6	100	83.4
15	185	30	16.2	100	83.8
16	167	30	18.0	100	82.0
17	185	30	16.2	100	83.8
18	156	30	19.2	100	80.8
19	217	30	13.8	100	86.2
20	219	30	13.7	100	86.3

No.	C.I.	C.F.	V.I. (ADN)	V.F.	BUFFER
21	178	30	16.9	100	83.1
22	183	30	16.4	100	83.6
23	178	30	16.9	100	83.1
24	177	30	16.9	100	83.1
25	177	30	16.9	100	83.1
26	193	30	15.5	100	84.5
27	170	30	17.6	100	82.4
28	198	30	15.2	100	84.8
29	184	30	16.3	100	83.7
30	162	30	18.5	100	81.5
31	194	30	15.5	100	84.5
32	192	30	15.6	100	84.4
33	210	30	14.3	100	85.7
34	219	30	13.7	100	86.3
35	181	30	16.6	100	83.4
36	178	30	16.9	100	83.1
37	217	30	13.8	100	86.2
38	198	30	15.2	100	84.8
39	172	30	17.4	100	82.6
40	191	30	15.7	100	84.3
41	157	30	19.1	100	80.9
42	157	30	19.1	100	80.9
43	165	30	18.2	100	81.8
44	12	30	250.0	100	---
45	27	30	111.1	100	---
46	7.1	30	422.5	100	---
47	41	30	73.2	100	26.8
48	92	30	32.6	100	67.4

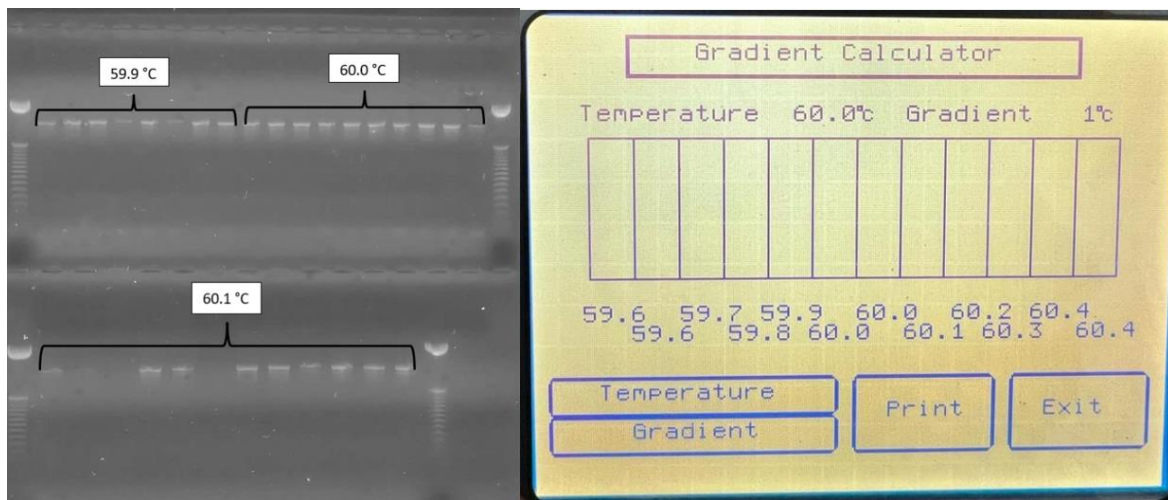
Nota. C.I. concentración inicial, C.F. concentración final, V.I. volumen inicial, V.F. volumen final.

### Gradiente de Temperatura en Termociclador para Prueba PCR

Para proceder al perfil térmico final y amplificar el fragmento de ADN de interés, se seleccionó la temperatura de hibridación del primer, de las muestras que mostraron una mejor amplificación al momento de ser observadas en el transluminador, las cuales fueron las 10 muestras que utilizaron el gradiente de temperatura a 60.0 °C (Figura 9). La temperatura optima en la fase de hibridación para las condiciones del laboratorio de Biotecnología Aplicada de la UIDC fue de 60 °C tal y como detalla en el Cuadro 5.

**Figura 9**

*Amplificación y gradiente de temperatura para amplificación de ADN de papaya*



*Nota.* Izquierda. Gel agarosa observado en transiluminador indicando que a 60 °C amplifico mejor las muestras. Derecha. Monitor del termociclador usado para realizar prueba PCR.

**Cuadro 5**

*Gradiente de temperatura utilizado para PCR para amplificación de ADN de papaya*

Fase	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	2 minutos	95
Desnaturalización	15 segundos	95
Acoplamiento	15 segundos	60
Extensión	45 segundos	72
Extensión final	5 minutos	72
Mantenimiento	-----	10

### **Amplificación**

El marcador presentó bandas o fragmento de ADN a 1300 pb (Figura 10). Este fragmento se observó, tanto en las muestras provenientes de plantas femeninas como en plantas con flores hermafroditas y macho, coincidiendo con los resultados obtenidos por Sánchez-Betancourt y Núñez Zarantes (2009).

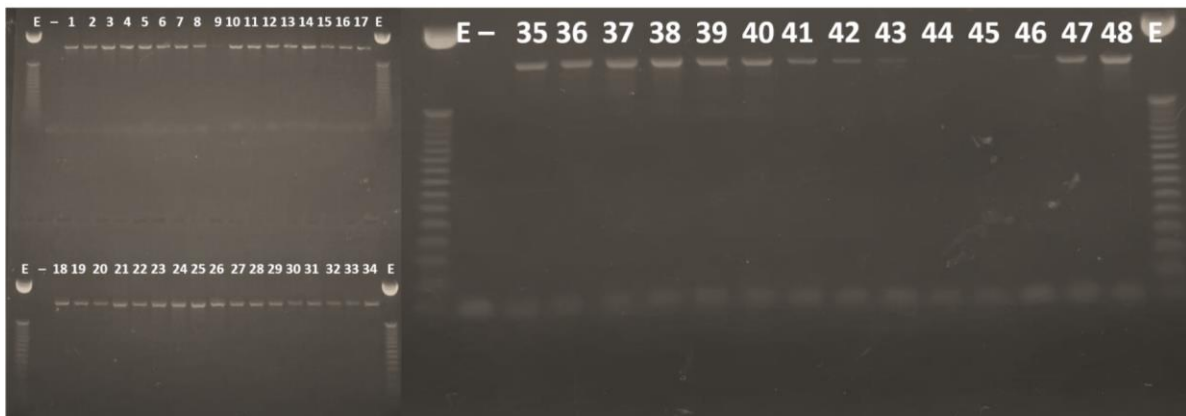
Es importante destacar que el iniciador T1, fue considerado por Deputy et al. (2002) como un control positivo para asegurar que las condiciones de las reacciones sean las necesarias para la

amplificación del ADN; puesto que es mencionado anteriormente, este iniciador amplifica tanto para las plantas hermafroditas, masculinas y femeninas.

Deputy et al. (2002) desarrollaron los marcadores SCAR denominados T1, T12 y W11, para lo que reportan que las combinaciones T12 y W11 amplificaron ADN en plantas hermafroditas y masculinas, raramente en las hembras de las variedades hawaianas de papaya, mientras que T1 amplificó en los tres tipos sexuales de plantas. Por otra parte, Sánchez-Betancourt y Núñez Zarantes (2009) trabajaron con 24 plantas de papaya de cultivares de la región de Mosquera en Cundinamarca, Colombia, con identificación sexual previa, y encontraron que el SCAR W11 fue específico para machos y hermafroditas, con ausencia de bandas en las hembras. En un trabajo más amplio, Saalau-Rojas et al. (2009) con el híbrido 'Pococí de Costa Rica', encontraron especificidad entre la amplificación con W11 y la condición de hermafrodita, con 98 % de concordancia en una muestra de 360 plantas.

### Figura 10

#### *Amplificación del ADN de papaya con cebador T1*



*Nota.* E: escalera molecular, -: control negativo, 1-20: bandas amplificadas provenientes de ADN de plantas de papaya femeninas. 21-40: bandas amplificadas provenientes de ADN de plantas de papaya hermafroditas. 41-48: bandas amplificadas provenientes de ADN de flores de papaya.

## **Conclusiones**

Se optimizó el protocolo de ADN para cultivo de papaya con altas concentraciones y de buena calidad.

Se optimizó perfil térmico del cebador T1 el cual amplificó en muestras de ADN proveniente de plantas con flores hermafroditas, machos y hembras.

## **Recomendaciones**

Utilizar el cebador T1 como control positivo para asegurarse que las condiciones de la reacción son óptimas.

Utilizar los marcadores moleculares SCAR W11 y T12 para la detección de plantas hermafroditas de papaya antes de trasplantar a campo.

## Referencias

- Aspeitia Echegaray V. dic. 2012. Estudio molecular, morfológico y fisiológico de semilla de papaya variedad maradol (*Carica papaya* L.) asociado con el sexo de las plantas [Tesis]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 60 p; [consultado el 18 de may. de 2022]. <https://cutt.ly/6HYaFUF>.
- Barrantes Santamaría W, Loría Quirós C, Gómez Alpizar L. 2019. Evaluación de dos sistemas de sexado en plantas de papaya (*Carica papaya*) híbrido Pococí 1. *Agronomía Mesoamericana*; [consultado el 21 de may. de 2022]. 30(2):437–446. es. <https://www.redalyc.org/journal/437/43759027009/html/>.
- Bogantes Arias A, Mora Newcomer E, Umaña Rojas G, Loría Quirós CL. [consultado el 31 de may. de 2022]. Guía para la producción de la papaya en Costa Rica. [sin lugar]: [sin editorial]. 53 p.
- Cajamar. 2015. El cultivo de la papaya; [consultado el 31 de may. de 2022]. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10997.pdf>.
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. 2020. Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN; [consultado el 31 de may. de 2022]. 3 a 10. <https://cutt.ly/1LnJEDI>.
- Deputy JC, Ming R, Ma H, Liu Z, Fitch MMM, Wang M, Manshardt R, Stiles JI. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 106(1):107–111. eng. doi:10.1007/s00122-002-0995-0.
- [IVAMI] Instituto Valenciano de Microbiología. 2017. Papaya (*Carica papaya*) – Identificación de sexo hemafrodita, femenino o macho por métodos moleculares - IVAMI. Valencia: [sin editorial]; [actualizado el 21 de may. de 2022.000Z; consultado el 21 de may. de 2022.250Z]. <https://cutt.ly/jLnJT3y>.
- Jiménez Díaz JA. 2002. Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana. 1ª ed. Guácimo, Costa Rica: EARTH. 126 p. ISBN: 9977-84-004-0; [consultado el 18 de may. de 2022]. <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/90022688.pdf>.
- Mora E, Bogantes-Arias A. 2013. Evaluación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) en Pococí, Limón, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 15(1):39. <https://cutt.ly/HLnJISz>.
- Rodríguez Cabello J, Díaz Hernández Y, Pérez González A, Cruz ZN, Rodríguez Hernández P. 2014. Evaluación de la calidad y el rendimiento en papaya silvestre (*Carica papaya* L.) de Cuba. *Cultivos Tropicales*; [consultado el 21 de may. de 2022.684Z]. 35(2):36–44. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362014000300004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362014000300004).
- Saalau-Rojas E, Barrantes-Santamaría W, Loría-Quirós CL, Brenes-Angulo A, Gómez-Alpizar L. 2009. Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.) híbrido "Pococi". *Agronomía Mesoamericana*; [consultado el 31 de may. de 2022].
- Sánchez-Betancourt E, Núñez Zarantes VM. 2009. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). *CTA*. 9(2):31–36. es\_ES. <http://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/115>. doi:10.21930/rcta.vol9\_num2\_art:115.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*; [consultado el 18 de may. de 2022]. 5(25):2540–2568. en. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56080>.

- Skroch PW, Geffroy V, Adam-Blondon A-F, Shirmohamadali A, Johnson WC, Llaca V, Nodari RO, Pereira PA, Tsai S-M, Tohme J, et al. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet.* 97(5-6):847–856. <https://cutt.ly/6LnJ9Pv>.
- Soto M. 2017. Científicos ticos identifican sexo de las papayas para mejorar su producción. *La Nación*; [consultado el 31 de may. de 2022.207Z]. [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v20n2\\_311.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n2_311.pdf).
- Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1(1):3–8. En;en. doi:10.1007/BF02680255.
- Valencia Sandoval K, Duana Ávila D, Hernández Gracia TJ. 2017. Estudio del mercado de papaya mexicana: un análisis de su competitividad (2001-2015). *Suma de Negocios.* 8(18):131–139. doi: 10.1016/j.sumneg.2017.10.002.