

NOTA TÉCNICA

Evaluación de dos marcadores tipo SCAR para la determinación del sexo en lechosa, variedad Maradol

Evaluation of two types of SCAR markers to determine sex in papaya variety Maradol

Andy Díaz-López¹, Luis Angulo Graterol²; Ariadne Vegas García¹, Yanet Sandra Rincón¹, Catalina Ramis² y Gustavo Saldaña Robespierre¹

¹Investigadores. Instituto de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Unidad de Biotecnología Agrícola Vegetal. Apdo. 4653. Maracay 2105, estado Aragua. Venezuela.

²Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA). Apdo. 4579. Maracay 2105, estado Aragua. Venezuela.
Correo electrónico: andiaz26@gmail.com

RESUMEN

La lechosa, *Carica papaya* L., presenta plantas femeninas, masculinas y hermafroditas, según el sexo de las flores que producen; siendo esta última idónea para los productores por generar frutos alargados, de cavidad interna pequeña, así como una morfología que permite una mayor resistencia a los daños ocasionados durante la postcosecha y el transporte. El sexo en las plantas de lechosa se puede determinar al inicio de la etapa de floración, que ocurre de 3 a 4 meses, posterior al trasplante a campo, porque para tener una plantación con mayoría de plantas hermafroditas se requiere la siembra de tres a cuatro semillas por hoyo para posteriormente descartar aquellas con flores ginoicas y androicas. El uso de marcadores moleculares para la determinación del sexo, representa una alternativa que contribuye al mejoramiento genético del cultivo, además de reducir los costos de producción. En este trabajo se planteó la evaluación de una PCR múltiple con dos iniciadores SCAR (T1 y W11) para la identificación del sexo en plantas de lechosa cultivar Maradol. El ADN fue extraído de hojas jóvenes de plantas en campo, escogidas de acuerdo al sexo, en la Unidad de Biotecnología Agrícola Vegetal del CENIAP, estado Aragua, Venezuela. En la presente metodología, se amplificaron dos fragmentos de 1300 y 800 pb para las plantas hermafroditas y un solo fragmento de 1300 pb para las femeninas. De esta manera, se validaron estos marcadores para el cultivar en nuestras condiciones de laboratorio con un 100% de correspondencia con la morfología floral.

Palabras clave: *Carica papaya* L., marcadores moleculares, primers, propagación, selección, sexaje.

ABSTRACT

Papaya, *Carica papaya* L., presents female, male and hermaphrodite plants, according to sex of the flowers they produce, the latter being the most suitable for generating elongated and small internal cavity fruits, morphology that confers greater damage resistance during post-harvest and transport. The sex of Papaya plants can be determined at the beginning of the flowering stage, which occurs 3-4 months after field transplant, because to have a plantation with a majority of hermaphrodite plants require 3 to 4 plants by hole later and discard those with gynoica and androic flowers. The use of molecular markers for sex determination, is an alternative that contributes to crop breeding, but also reduce production costs. In this paper the evaluation of a multiplex PCR was made with two SCAR primers (T1 and W11) for sex identification in Maradol papaya plants. DNA was extracted from young leaves of plants in the field, chosen according to sex, in the Unidad de Biotecnología Vegetal of CENIAP, Aragua, Venezuela. In this methodology, two fragments of 1300 and 800 bp for hermaphrodite plants and one 1300 bp fragment was amplified for female. Thus, these markers for Papaya Maradol in our laboratory conditions with a 100% correspondence with the floral morphology were validated.

Key words: *Carica papaya* L., molecular markers, primers, propagation, selection, sexing.

INTRODUCCIÓN

La lechosa (*Carica papaya* L.) es una especie dicotiledónea, diploide ($2n=18$) que pertenece a la familia Caricaceae, género *Carica*, cuyo origen se ubica en las tierras bajas de América Tropical, en la región, específicamente desde el sureste de México hasta Costa Rica. Este fruto fue descrito por primera vez en el año 1526 por el historiador Fernández de Oviedo (Jiménez, 2002).

La importancia económica del cultivo de la lechosa radica en la producción de fruta fresca para el consumo, preparación de jugos, dulces y en la obtención de la papaína, que es una enzima proteolítica presente en el látex lechoso de los frutos y el tallo, la cual es utilizada en la industria de alimentos y perfumería; además, en la industria textil se usa como suavizante de lana y seda (Urasaki *et al.*, 2002).

Cabe destacar, que el sexo de las plantas de lechosa solo se puede determinar a través de sus flores y éstas se forman, dependiendo del cultivar, a partir de los 3 meses de ser trasplantadas en el campo. Por lo tanto, para asegurar plantas productivas con frutos comerciales, es necesaria la siembra de tres a cuatro plantas por punto, seguido del descarte de plantas con flores femeninas y masculinas, luego de la floración; ya que no existen diferencias embriológicas, ni morfológicas entre los tres tipos sexuales en etapas tempranas antes de la prefloración (Rojas *et al.*, 1985).

La práctica del descarte en el campo, trae como consecuencia un aumento en los costos de producción y requiere mayor cantidad de semillas y plantas por superficie; así como de insumos para el mantenimiento de las plantas hasta el momento de ser eliminadas. Además, el costo de la mano de obra especializada en el reconocimiento de la morfología floral para distinguir los tipos sexuales existentes en la especie. Por tanto, determinar el sexo en etapas tempranas del desarrollo, permite reducir los costos, al facilitar la siembra de plantas únicamente hermafroditas (Parasnis *et al.*, 1999; Mora y Bogantes, 2005; Urasaki *et al.*, 2002; Saalau-Rojas *et al.*, 2009).

El cultivar Maradol fue desarrollado en Cuba, y como otros cultivares mejorados, no presenta plantas androicas con flores de sexo masculino

(Ramos y Ramos, 2002), a diferencia de las poblaciones criollas o silvestres (Pares-Martínez *et al.*, 2004). Debido a esta razón y a otras características morfológicas y agronómicas como: uniformidad de plantas de bajo porte, mayor productividad y calidad de los frutos; estos cultivares e híbridos importados del grupo Maradol sustituyan las poblaciones criollas (Aular y Casares, 2011).

Existen propuestas para que el sexo en esta especie sea determinado por un gen simple con tres alelos, que son: M (masculino), m (femenino) y M^h (hermafrodita), descritos por Liu *et al.* (2004). Las plantas femeninas son homocigotas recesivas para este gen (mm), mientras que las masculinas (Mm) y hermafroditas (M^hm) son heterocigotas, con 25% de semillas no viables en sus frutos, porque cada combinación de alelos dominantes (MM, MM^h , M^hM^h) es letal, por tanto no se forma el embrión (Storey, 1953).

Se realizaron diversos estudios para el establecimiento de un sistema que permita la determinación del sexo en lechosa, incluyendo, análisis morfológico de las flores, citológico, isoenzimático, contenido de fenoles y análisis de ARN (Datta, 1971; Jindal y Singh, 1976; Castro *et al.*, 2002; Rangel y Castro, 2010). Estos métodos no resultaron satisfactorios en la identificación de plantas andromonoicas en la etapa vegetativa, y solo permitió distinguir plantas con flores femeninas de plantas con flores masculinas; además, fue poco eficiente en el análisis de un mayor número de muestras.

De igual manera, se ha generado el interés en desarrollar e implementar métodos sencillos y precisos que permitan identificar el sexo en plantas de lechosa antes de su trasplante definitivo a campo, utilizando técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esto hizo posible el desarrollo de algunos marcadores moleculares que han demostrado resultados positivos, basados en fragmentos de ADN, amplificados mediante el uso de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) y microsatélites (Parasnis *et al.*, 1999; Deputy *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002; Niroshini *et al.*, 2008; Chaves-Bedoya *et al.*, 2009; Saalau-Rojas *et al.*, 2009).

En la técnica RAPD se usan iniciadores arbitrarios, y en las otras metodologías, iniciadores específicos al ADN blanco.

En la actualidad, la disponibilidad de los marcadores moleculares para la determinación del sexo, es incipiente y dependiente del cultivar, por lo que algunos de los iniciadores desarrollados no son de utilidad para la identificación temprana de plantas comerciales, como es el caso de los iniciadores OT-7 y CPSM-64 (Rangel y Castro, 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos iniciadores SCAR descritos en la metodología de Deputy *et al.* (2002), para identificar el sexo en plantas de lechosa, cultivar Maradol, mediante el empleo de una PCR múltiple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron hojas jóvenes de cuatro plantas ginoicas y cuatro plantas andromonoicas de lechosa cultivar Maradol establecidas en campo en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), provenientes de una planta seleccionada en una población sembrada en el sector La Molinera, San Francisco de Asís, estado Aragua, Venezuela. Las plantas seleccionadas se encontraban en fase de floración para corroborar

la eficiencia de la metodología (Figura 1). Este cultivar mejorado no presenta plantas androicas, razón por la que no fueron incluidas en el trabajo.

Las características consideradas de interés para la selección de la planta madre se presentan en el Cuadro.

La extracción del ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología Vegetal, INIA-CENIAP y los análisis moleculares se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Núcleo Maracay.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN se siguió la metodología descrita por Risterucci *et al.* (2000); Pérez-Almeida *et al.* (2011), con las siguientes modificaciones:

A) La incubación de las muestras se realizó a 70 °C por 60 min en un baño térmico marca Precisión Modelo 184 y la centrifugación a 8500 rpm en una centrífuga Sigma 2K15 refrigerada por 20 min a 16 °C.

B) Luego del tratamiento con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agregó al sobrenadante 700 µl de isopropanol frío para la precipitación del ADN y 70 µl de acetato de sodio 3 M.



Figura 1. A: Detalle de planta andromonoica de lechosa cultivar Maradol seleccionada en el sector La Molinera, San Francisco de Asís, estado Aragua. B: Plantas ginoicas y andromonoicas muestreadas en la Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP en fase de floración.

Cuadro. Características morfológicas y agronómicas de interés para la selección.

Características de la planta madre	Descriptor
Tallo	Simple, de color gris-marrón en parte media y verde en el área no suberizada.
Longitud media del entrenudo (cm)	2,2
Número de nudos a la primera flor	36
Altura a la primera cosecha (m)	1,54
Longitud del pecíolo de la hoja madura (cm)	65
Ancho de la hoja (cm)	69,4
Número de lóbulos por hoja	12
Inflorescencias	Con un máximo de 4 flores hermafroditas y estériles femeninas de color blanco crema.
Frutos	Cantidad mínima de 55, con un peso promedio de 2 kg, forma alargada, pulpa de color anaranjado y 1,72 g por 100 semillas.

Amplificación de ADN

Las muestras de ADN de cada planta fueron amplificadas con los iniciadores W11-F (CTGATGGCGTGTGGCTCTA), W11-R (CTGATGCGTGATCATCTACT), T1-F (TGCTCTTGATATGCTCTCTG), T1-R (TACCTTCGCTCACCTCTGCA) tomados de Deputy *et al.* (2002) y siguiendo la metodología de Saalau-Rojas *et al.* (2009). Para dicha amplificación, se realizó una PCR utilizando cada cebador por separado y una PCR múltiple en un termociclador BIORAD PTC-100. Los productos de este proceso fueron observados con luz UV, utilizando un transiluminador Fisher Biotech FBTIV-614. Finalmente, la determinación del tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se realizó con un equipo Chemidoc XRS y el programa QuantityOne versión 4.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la PCR simple, se originaron dos fragmentos de ADN de 1300 pb y 800 pb para la combinación T1-F/T1-R y W11-F/W11-R, respectivamente. De esta manera, se verificó la

amplificación de cada uno de los iniciadores por separado. El fragmento de 1300 pb se observó, tanto en las muestras provenientes de plantas femeninas como hermafroditas, mientras que el fragmento de 800 pb amplificó solo en las plantas hermafroditas, coincidiendo con los resultados de Sánchez-Betancourt y Núñez (2008) cuando realizan una PCR simple con ambos cebadores (Figura 2).

Cuando los iniciadores se utilizaron combinados, se observaron dos fragmentos de amplificación en las muestras de plantas hermafroditas, uno de 1300 pb correspondiente al SCAR T1 y otro fragmento de 800 pb correspondiente al SCAR W11. Por otro lado, el SCAR W11 no produjo ningún fragmento en las muestras de plantas femeninas, por lo que este iniciador puede ser utilizado para discriminar entre ambos tipos sexuales. Lo anterior, fue descrito por Saalau-Rojas *et al.* (2009), al utilizar los mismos iniciadores en la lechosa híbrido Pococí.

Se demostró una coincidencia del 100% entre la aplicación de la técnica de PCR y la morfología floral de las plantas seleccionadas para el estudio (Figura 3).

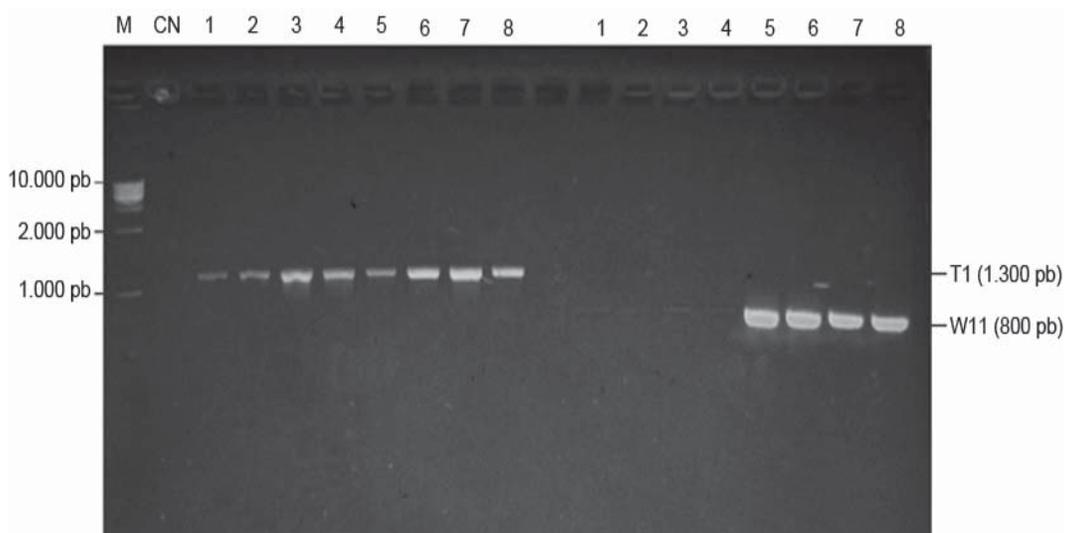


Figura 2. Perfil generado por los cebadores T1 y W11 usados por separado en el cultivar Maradol. M: marcador de peso molecular de 1 kb; CN: control negativo sin ADN; Carriles 1-4: plantas femeninas; Carriles 5-8: plantas hermafroditas.

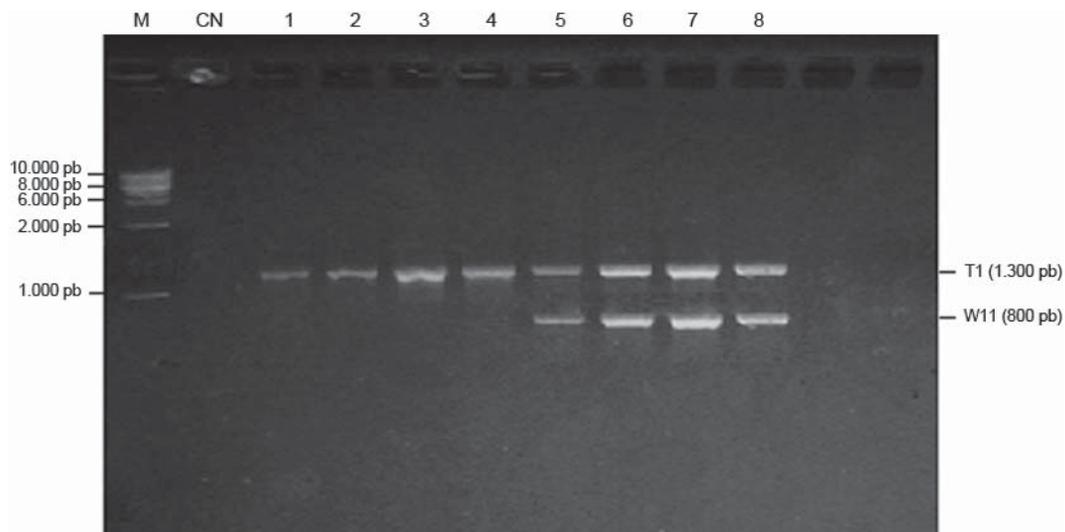


Figura 3. Perfil generado por los cebadores T1 y W11 en combinación con el cultivar Maradol. M: marcador de peso molecular de 1 kb, CN: control negativo sin ADN Carriles 1-4: plantas femeninas con fragmentos amplificados de 1300 pb con el cebador T1; Carriles 5-8: plantas hermafroditas con fragmentos de ADN amplificados de 1300 y 800 pb.

Este resultado coincide con lo esperado, considerando que Deputy *et al.* (2002) reportan 99,2% de fiabilidad de la técnica, mientras que Magdalita y Mercado (2003) señalan 100%

en los cultivares Cariflora, Cavite Special y el híbrido Sinta. También, Saalau-Rojas *et al.* (2009) mencionan 96-98% de similitud en el híbrido Pococí.

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 como para las femeninas y se encuentra a 7 cM del gen *Sex1* responsable de la determinación del sexo en el cultivo.

Por su parte, el iniciador W11 se encuentra a 0,3 cM del gen *Sex1* en el cromosoma Y, por esta razón se selecciona en el estudio de Deputy *et al.* (2002).

Según Liu *et al.* (2004), las plantas masculinas y hermafroditas poseen el cromosoma Y en el que se encuentra este gen, lo que pudiera explicar la amplificación del fragmento de 800 pb en ambos tipos sexuales, que no permite la diferenciación entre ellos.

Un aspecto significativo es que la precisión de los iniciadores utilizados para la identificación del sexo en la lechosa, está en dependencia del cultivar. Tal es el caso del iniciador W11, el cual fue desarrollado utilizando cultivares de tipo Hawaiano y que al ser probado en cultivares del grupo Formosa, se observa la presencia de falsos positivos y falsos negativos (De Oliveira *et al.*, 2007). No obstante, el iniciador W11 fue capaz de identificar, inequívocamente, plantas hermafroditas en el cultivar Maradol, logrando discriminar éstas de las plantas femeninas, por lo que es muy útil, en vista de que permite diferenciar en forma precisa estos dos tipos sexuales.

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio validó su uso en el cultivar Maradol, utilizando los iniciadores T1 y W11 en una PCR múltiple, permitiendo la discriminación de plantas hermafroditas y femeninas, lo que demuestra en cada una de ellas, un patrón de fragmentos característico, haciendo posible la identificación rápida y eficiente del sexo de plantas en fase de vivero.

Asimismo, esta metodología será de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético del cultivo, para seleccionar plantas hermafroditas

que presenten características agronómicas deseables y con resistencia a enfermedades y plagas.

La implementación de la técnica de PCR múltiple para la identificación del sexo en la lechosa, dependerá de la relación costo/beneficio que tenga el productor como consecuencia del establecimiento del cultivo con plantas hermafroditas y la reducción de los costos por inversión de recursos y mantenimiento de plantas femeninas no deseadas.

CONCLUSIONES

Los iniciadores SCAR T1 y W11 permitieron corroborar el sexo de plantas de lechosa ginóicas y andromonoicas del cultivar Maradol, mediante una PCR múltiple y con la utilización de muestras de hojas jóvenes para la extracción del ADN de plantas establecidas en campo, obteniéndose una correlación completa entre los resultados moleculares y el sexo de las plantas muestreadas.

El hecho de que el cultivar no produce plantas androicas, al igual que en otros cultivares comerciales, es una ventaja para el uso de la técnica, ya que se logra diferenciar los sexos. Por tal razón, se recomienda realizar un análisis de costos para la implementación de la técnica a nivel práctico.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Plan Nacional de Semillas (PNS) del INIA por el financiamiento de este trabajo de investigación a través de la acción: Desarrollo de cultivares y producción de semilla genética de lechosa en el estado Aragua (Cod.: 7-28-02-06-01).

LITERATURA CITADA

- Aular, J. y M. Casares. 2011. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33:187-198.
- Castro, L., O. Ruíz, M. Vielma y A. Briceño. 2002. Determinación sexual en *Carica papaya* L. *Pittieria*. N° 31:25-32.

- Chaves-Bedoya, G., M. Pulido, E. Sánchez-Betancourt y V. Núñez. 2009. Marcadores RAPD para la identificación del sexo en papaya (*Carica papaya* L.) en Colombia. *Agronomía Colombiana*. 27(2):145-149.
- Datta, P. 1971. Chromosomal biotypes of *Carica papaya* Linn. *Cytologia*. 36:555-562.
- De Oliveira, E., J. Loyola, M. Da Silva, D. Souza, H. De Souza e T. Nunes. 2007. Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 42(12):1.747-1.754.
- Deputy, J., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt y J. Stiles. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:107-111.
- Jiménez, J. 2002. Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana. 1ª ed. Editorial Earth. Guácimo. Costa Rica. 108 p.
- Jindal, K. and R. Singh. 1976. Sex determination in vegetative seedlings of *Carica papaya* by phenolic tests. *Scientia Horticulturae* 4(1):33-39.
- Liu, Z., P. H. Moore, H. Ma, C. M. Ackerman, M. Ragiba, Q. Yu, H. M. Pearl, M. S. Kim, J. W. Charlton, J. I. Stiles, F. T. Zee, A. H. Paterson and R. Ming. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*. 427:348-352.
- Magdalita, P. and C. Mercado. 2003. Determining the sex of papaya for improved production. Food Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Los Baños College, Laguna, Philippines. pp. 1-6. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/article7eb534html>. [04 de mayo de 2012].
- Mora, E. y A. Bogantes. 2005. Estudio de una mutación en papaya (*Carica papaya* L.) que produce la letalidad de plantas femeninas. *Agronomía Mesoamericana*. 16:89-94.
- Niroshini, E., J. Everard, E. Karunanayake and T. Tirimanne. 2008. Detection of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to sex expression in *Carica papaya* L. *J. Nat. Sci. Foundation Sri Lanka* 36:145-150.
- Parasnis, A., W. Ramakrishna, K. Chowdari, V. Gupta and P. Ranjekar. 1999. Microsatellite (GATA)_n reversal sex-specific differences in papaya. *Theor. Appl. Genet.* 99:1.047-1.052.
- Pares-Martínez, J., R. Linarez, M. Arizaleta y L. Melendez. 2004. Aspectos de la biología floral en lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena roja, en el estado Lara, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21:116-125.
- Pérez-Almeida, I., L. Angulo, G. Osorio, C. Ramis, A. Bedoya, R. Figueroa-Ruíz, S. Molina y D. Infante. 2011. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* sp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*. 23(1):27-34.
- Ramos, R. y J. Ramos. 2002. Instrucciones técnicas para el cultivo de la papaya Maradol Roja. Manual Técnico. Ed. Empresa de Semillas. Cuba. 39 p.
- Rangel, S. y T. Castro. 2010. Estudio de la secuencia ot-7 en la determinación del sexo en lechosa (*Carica papaya* L.). Universidad Nacional Experimental del Sur del Lago. *Producción Agropecuaria*. 3(1):3-6.
- Risterucci, A., L. Grivet, J. N'Goran, I. Pieretti, M. Flament and L. Lanaud. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 101:948-955.
- Rojas, T., R. Ramos y R. Salazar. 1985. Posible relación del sexo con algunas características morfológicas y agronómicas de la papaya, *Carica papaya*. *Acta Agronómica*. 35:20-33.
- Saalau-Rojas, E., W. Barrantes-Santamaría, C. Loría-Quirós, A. Brenes-Angulo y L. Gómez-Alpizar. 2009. Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.) híbrido "Pococi". *Agronomía Mesoamericana*. 20(2):311-317.
- Sánchez-Betancourt, E; Núñez, V. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de

- papaya (*Carica papaya* L.). Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 9(2):31-36.
- Storey, W. 1953. Genetics of papaya. J. Hered. 44:70-78.
- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano, H. Tanaska, H. Oku, I. Chinen and R. Terauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). Theor.Appl. Genet. 104:281-285.