

Marcadores RAPD para la identificación del sexo en papaya (*Carica papaya* L.) en Colombia

RAPD markers for sex identification in papaya (*Carica papaya* L.) in Colombia

Giovanni Chaves-Bedoya^{1,2}, Mauricio Pulido¹, Erika Sánchez-Betancourt¹ y Víctor Núñez¹

RESUMEN

La determinación del sexo en plantas de papaya es considerado un sistema intrigante, debido a que esta especie presenta tres sexos (macho, hembra y hermafrodita) determinados por un locus multialélico. Además, esta especie no presenta cromosomas sexuales morfológicamente diferenciables. Los marcadores moleculares pueden asociarse a características de interés, como en el presente caso, al sexo en plántulas de papaya. Con el objetivo de identificar marcadores moleculares que permitan una rápida identificación del sexo en genotipos colombianos de plántulas de papaya, se aplicó la técnica RAPD (amplificación aleatoria de polimorfismos del ADN). El estudio encontró tres marcadores RAPD polimórficos, los cuales permitieron diferenciar los sexos de la papaya. Dos marcadores fueron específicos para plantas macho y hermafrodita, y un tercero para plantas hembra. Estos nuevos marcadores moleculares podrán ser beneficiosos en la determinación del sexo en genotipos colombianos de papaya.

Palabras clave: *Carica papaya*, plantas dioicas, determinación sexual.

ABSTRACT

Sex definition in papaya is considered an intriguing system, due to the fact that the plant presents three different sexes (male, female and hermaphrodite), which are determined on a multi-allelic locus. Moreover, the plant does not have morphologically differentiated sexual chromosomes. Provided that molecular markers can be associated to traits of interest, in the present study they were applied to rapid sex identification in seedlings of Colombian papaya genotypes. With the aim of finding such markers, an RAPD technique (Randomly Amplified Polymorphic DNA) was applied. The study allowed identifying three polymorphic RAPD markers apt for differentiating the sexes in papaya. Two of them are specific for male and hermaphrodite plants, and one for female plants. These novel molecular markers will be valuable for sex determination in Colombian genotypes of papaya.

Key words: *Carica papaya*, dioecious plants, sexual determination.

Introducción

La papaya es una planta dicotiledónea, polígama diploide (Parasnis *et al.*, 1999; Ming *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004) que pertenece a la familia Caricaceae, género *Carica* (Badillo, 2002). El germoplasma de papaya presenta una considerable variación fenotípica para la mayoría de los rasgos hortícolas importantes, incluyendo tamaño, forma, color, contenido de azúcar y sabor del fruto, entre otros (Kim *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007). La posibilidad de transformación genética, la eficiencia de los cruzamientos, la producción de abundante descendencia y la continua floración a lo largo del año hacen de la papaya un modelo atractivo para investigación genética y genómica (Ming *et al.*, 2001).

En Colombia, el cultivo de la papaya se encuentra en el octavo lugar por área sembrada respecto a otras frutas cultivadas, siendo un fruto económicamente importante. La papaya proporciona frutos y látex económicamente valiosos en las áreas tropicales y subtropicales (Ming *et al.*, 2001; Urasaki *et al.*, 2002). Por ejemplo, la papaína, una enzima proteolítica abundante en el látex lechoso de los frutos, se usa en la industria alimenticia y textilera para suavizar la lana, la seda, y en la industria de perfumería (Villegas, 1997; Urasaki *et al.*, 2002). Además, la planta de papaya es importante por sus tallos, hojas y raíces los cuales son empleados en un amplio rango de aplicaciones en la medicina popular (Ming *et al.*, 2001).

Fecha de recepción: 13 de diciembre de 2008. Aceptado para publicación: 2 de julio de 2009

¹ Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Mosquera (Colombia).

² Autor de correspondencia. gchavesb@unal.edu.co

La presencia de las tres formas sexuales –macho, hembra y hermafrodita– en esta especie ofrece varias ventajas para estudios genéticos y evolutivos. Posee un genoma pequeño de 372 megabases (Mb), contenido en nueve pares de cromosomas, un tiempo corto de floración de 9 a 15 meses, numerosos tipos de flores y un intrigante sistema de determinación sexual, por lo que su diferenciación ha sido tema frecuente de análisis genéticos. La papaya posee un cromosoma Y primitivo, con una región macho específica, que corresponde aproximadamente al 10% del cromosoma, pero que ha pasado por una severa supresión de recombinación y degeneración de la secuencia de ADN (Liu *et al.*, 2004).

Storey (1953) concluyó que el sexo en papaya es determinado por un gen simple con tres alelos: M, macho; M^h, hermafrodita; y m, hembra. Las hembras (mm) son homocigotas recesivas. Los machos (Mm) y hermafroditas (M^hm) son heterocigotos, típicamente con el 25% de semillas no viables en sus frutos, porque cada combinación de los alelos dominantes (MM, MM^h o M^hM^h) es embriogénicamente letal (Parasnis, 1999; Ming *et al.*, 2001; Urasaki *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Posteriormente se sugirió que M y M^h representan regiones genéticamente inactivas de los cromosomas sexuales en las cuales genes vitales se perdieron (Liu *et al.*, 2004).

Estudios citológicos para la identificación de cromosomas sexuales heteromórficos en papaya no han sido exitosos (Parasnis *et al.*, 1999; Viskot y Hobza, 2004; Ming *et al.*, 2007). Estos estudios sugieren que los cromosomas X y Y de papaya son morfológicamente homólogos a los autosomas. Lo anterior sugiere que los cromosomas están en etapas iniciales de diferenciación, en comparación con otras especies vegetales, también de naturaleza dioica, como es el caso de *Silene latifolia*, donde se encuentran cromosomas sexuales heteromórficos perfectamente diferenciados (Farbos *et al.*, 1999; Filatov *et al.*, 2000; Atanassov *et al.*, 2001; Filatov *et al.*, 2001).

De otra parte, la investigación molecular ha permitido encontrar resultados positivos en la identificación de diferentes tipos de marcadores, incluyendo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Parasnis *et al.*, 2000; Deputy *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002; Chaves-Bedoya y Núñez, 2007), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Deputy *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002), microsatélites (Parasnis *et al.*, 1999) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) capaces de discriminar sexo en plantas de papaya; estos se pueden utilizar para la pronta

determinación del sexo de papaya. La ausencia de falsos positivos y falsos negativos sexuales de acuerdo con el genotipo es un factor predominante para la elección de la adecuada selección de los marcadores moleculares, incluso en la fase de plántula. Esto se hace más significativo al considerar los híbridos de diferentes grupos, con una amplia diversidad genética.

La aplicación de marcadores RAPD para la identificación del sexo de papaya en estado juvenil puede facilitar enormemente el manejo del cultivo y el mejoramiento de la producción, mediante la ganancia en tiempo, espacio y costos, que de otra manera se requieren en el crecimiento de plantas de sexo indeseado.

Si el sexo de las plantas dioicas de papaya se identifica en estado de plántula, permitiendo obtener antes del trasplante a campo la proporción adecuada de plantas con el sexo deseado, se pueden ahorrar recursos como suelo, fertilizantes y agua, pudiendo ser dedicados al manejo del cultivo de solo plantas hembra o solo plantas hermafroditas (Chaves-Bedoya y Núñez, 2007). Una planta hembra de papaya produce alrededor de 100 frutos en su ciclo de vida y cerca de 250 g de papaína cruda por año. En plantaciones derivadas de semillas en donde aún existen machos, un incremento en el número de árboles de papaya hembra y hermafroditas por hectárea de terreno puede incrementar directamente la producción de frutos y papaína, haciendo este cultivo más rentable.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar marcadores moleculares RAPD para diferenciar el sexo en plantas de papaya como base para la aplicación práctica en plantaciones comerciales.

En este trabajo reportamos tres nuevos marcadores RAPD, capaces de discriminar de manera reproducible el sexo en plantas colombianas de papaya.

Materiales y métodos

Material vegetal y extracción de ADN genómico

El material vegetal usado en el estudio fue colectado en el año 2004. Este fue obtenido del Centro de Investigación Corpoica, La Libertad, ubicado en Villavicencio, departamento del Meta (Colombia). Lo constituyen los cultivares de papaya Catira desarrollada por Corpoica y las accesiones ILS 647 y ILS 649. El ADN genómico fue extraído de hojas jóvenes usando el método estándar de CTAB con modificaciones menores (Chaves-Bedoya y Núñez, 2007).

Amplificación PCR de los fragmentos sexuales específicos

La PCR para RAPDs (Williams *et al.*, 1990) fue llevada a cabo para volúmenes de 25 μ L que contenían 1,2 ng de ADN, 1 μ M del primer OP-A1 (5' CAGGCCCTTC 3'), OP-L1 (5' GGCATGACCT 3') y OP-P11 (5'GTAGACCCGT 3'), 1U taq polimerasa, 0,2 mM de dNTPs, 1X buffer de amplificación, 1,5 mM de MgCl₂. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MJ Research PT200, con una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C por 60 s y 44 ciclos con un perfil térmico para cada ciclo de 94°C por 60 s, 36°C por 60 s, 72°C por 60 s; luego de esto, un ciclo de extensión final a 72°C por 120 s. Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y visualizados en un documentador de geles, Hitachi®, luego de la tinción con bromuro de etidio (0,1 μ g mL⁻¹). El tamaño de las bandas se determinó utilizando como patrón el marcador de 250pb (DNA ladder, Promega).

Resultados y discusión

Mediante el uso de primers decámeros de la serie *Operon technologies* seleccionados al azar se encontraron dos marcadores moleculares RAPDs que permiten discriminar plantas de papaya machos y hermafroditas de las hembras. Con los oligos OP-A1 y OP-L1 se pudo amplificar, de manera reproducible, una banda de 1050 y 850 pb, respectivamente, tanto en los materiales de papaya macho como hermafrodita (Figs. 1A y 1B).

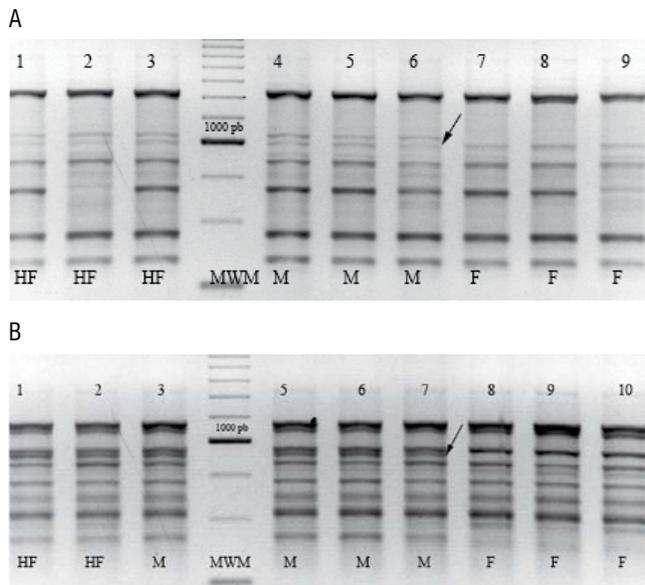


FIGURA 1. A. Amplificación de los genomas de papaya con el primer OP-A1. B. Amplificación con el primer OP-L1. HF, plantas hermafroditas; M, plantas machos y F, plantas hembras; MWM, marcador de peso molecular de 250 pb.

A pesar de que la papaya posee cromosomas sexuales homomórficos, la región amplificada con los marcadores OP-A1 y OP-L1 podría estar localizada en una región cromosómica específica común para machos y hermafroditas, lo que podría indicar diferenciación cromosómica entre estos sexos (Urasaki *et al.*, 2002). El resultado indicado en la Fig. 1 es consistente con el trabajo de Liu *et al.* (2004), en el que se reporta una región específica denominada MSY (*Male Specific Region*) con secuencia idéntica compartida por machos y hermafroditas (Vyskot y Hobza, 2004; Kazama y Matsunaga, 2008), sugiriendo así que estos dos sexos podrían compartir un haplotipo para esta región que difiere de las hembras. Además, estos dos sexos comparten, a nivel cromosómico, información para el cromosoma Y, ausente en hembras (Liu *et al.*, 2004).

Por otro lado, el primer OP-P11 permitió discriminar plantas hembras de plantas machos y hermafroditas al amplificar una banda de 1.750 pb (Fig. 2). Esto podría sugerir que el OP-P11 estaría en una región específica para hembras, sobre el cromosoma X. Teniendo en cuenta que en los cultivos comerciales se manejan solamente plantas hembras y hermafroditas, y estas últimas son preferidas por su forma, sabor y facilidad de empaque, el empleo del primer OP-P11 sería de gran importancia para diferenciar estos dos tipos sexuales. Esta diferenciación puede apoyar el trabajo del agricultor al permitir discriminar el sexo de las plántulas, y por tanto sembrar solo plantas del sexo deseado, por ejemplo, plantas hermafroditas.

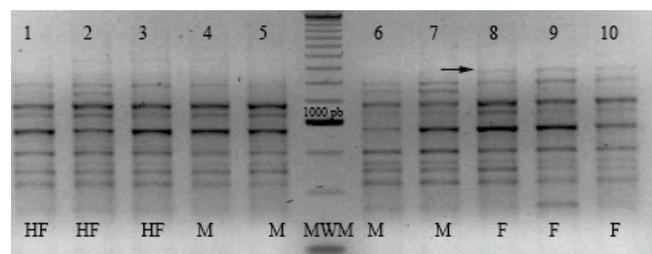


FIGURA 2. Amplificación de los genomas de papaya con el primer OP-P11. HF, plantas hermafroditas; M, plantas machos y F, plantas hembras; MWM, marcador de peso molecular (250 pb).

Los trabajos reportados por Gangopadhyay *et al.* (2007) utilizando marcadores ISSR, Deputy *et al.* (2002), Magdalita y Mercado (2003) y Sánchez-Betancourt y Núñez (2008), establecen que se han identificado marcadores ADN que discriminan el sexo en plantas de papaya hembras. En los estudios de Deputy *et al.* (2002) y Sánchez-Betancourt y Núñez (2008) se empleó el marcador SCAR T1. Este generó una banda en todos los sexos de papaya por lo que no se puede usar como discriminante de sexo, pero sí como un

control positivo de amplificación. Puesto que el marcador molecular OP-P11 presenta una banda específica para hembras, se considera de gran importancia para la determinación temprana del sexo en plantas de papaya. La amplificación de este marcador en plantas de papaya hembra permite verificar que se cuenta con una muestra de este sexo y no con un falso positivo por ausencia de amplificación, como sucedería si solo se emplean los marcadores RAPDs OP-A1 y OP-L1.

Los tres marcadores moleculares RAPDs encontrados en este trabajo se pueden usar en la identificación del sexo de las plantas de papaya en vivero. Además, a partir de estos marcadores se pueden diseñar marcadores SCAR que permitan una identificación más confiable de los materiales en estudio, como se ha realizado en trabajos previos (Deputy *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002; Chaves-Bedoya y Núñez, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

En la hipótesis de letalidad zigótica para la determinación de sexo en papaya (Storey, 1953), se propone un locus (Sex1) con tres alelos. De acuerdo con la hipótesis de Storey, los fragmentos amplificados con los primers OP-A1 y OP-L1 podrían estar localizados en el segmento cromosómico que incluye los alelos M y M^h de machos y hermafroditas, respectivamente, mientras la amplificación con el primer OP-P11 estaría sobre el alelo m de plantas hembras. Asimismo, Viskot y Hobza (2004) reportan similitud de secuencias de ADN entre la región MSY (*Male Specific Region*) de plantas macho y hermafroditas, en contraste con su divergencia de la correspondiente región ligada al X, por lo que se podría inferir que estos marcadores se ubican sobre estas regiones.

Por otra parte, luego de emplear los primers reportados por Urasaki *et al.* (2002) como discriminantes de sexo, los resultados de este trabajo no coincidieron con los presentados por esos autores (datos no mostrados). El hecho de utilizar primers de 20 nucleótidos, altamente específicos, podría sugerir diferencias a nivel genómico, por lo cual los materiales asiáticos no respondieron de la misma manera. A nivel fenotípico estas diferencias también podrían presentarse por la variabilidad en algunas características hortícolas como tamaño, forma, color, sabor y dulzura del fruto, estatura de la planta, estambres carpelodicos y aborto de carpelos. Además, los cultivares de papaya pueden ser líneas ginodioicas endogámicas, poblaciones dioicas auto-cruzadas u ocasionalmente clones (Kim *et al.*, 2002).

Igualmente, estas diferencias se pueden deber a la acumulación de secuencias repetitivas, las cuales están involucradas

en la evolución de los cromosomas sexuales (Ainswort, 2000; Shunsuke *et al.*, 2002). Un arreglo de duplicaciones de secuencias ligadas al cromosoma Y y la existencia de familias de genes sobre este cromosoma han sido recientemente observadas en papaya. Aun así, no es claro si las secuencias duplicadas ligadas al cromosoma Y tienen un rol similar para mantener la función del cromosoma Y en las plantas como en los animales (Viskot y Hobza, 2004).

Conclusiones

Puesto que la sexualidad en papaya no puede ser diferenciada con anterioridad al inicio de la floración, el hallazgo de marcadores moleculares que permitan la determinación del sexo podría facilitar el cultivo selectivo de estas plantas. Aunque el uso de técnicas moleculares represente un costo directo para agricultores o propietarios de viveros comerciales, en procesos a gran escala se pueden reducir costos como inversión de recursos y tiempo que se destina al mantenimiento de plantas del sexo no deseado. Además, al momento de efectuar un trasplante en un cultivo se podría tomar la decisión sobre la relación deseada de hembras y hermafroditas en la plantación comercial.

Aunque existen reportes en los que se ha encontrado determinación temprana del sexo en papaya mediante técnicas moleculares (Parasnis *et al.*, 1999; Deputy *et al.*, 2002; Macedo Lemos *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002), en el presente estudio se observó que los marcadores moleculares empleados para la diferenciación sexual en genotipos de papaya diferentes a los colombianos no permiten la discriminación en estos últimos, es decir, que la precisión de los marcadores es variable entre los genotipos. Con esto se infiere que los genotipos de papaya varían de una región a otra, posiblemente como consecuencia de la acumulación de secuencias repetitivas y duplicación de genes que resultan de la interacción del genoma con el ambiente.

Los nuevos marcadores RAPD OP-A1, OP-P11 y OP-L1 reportados en este trabajo mostraron la capacidad de discriminar invariablemente el sexo de genotipos colombianos de papaya.

Literatura citada

- Ainswort, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Ann. Bot.* 86, 211-221.
- Atanassov, I., C. Delichère, D. Filatov, D. Charlesworth, I. Negrutiu y F. Monéger. 2001. Analysis and evolution of two functional Y-linked loci in a plant sex chromosome system. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2162-2168.

- Badillo, V.M. 2002. *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10, 74-79.
- Chaves-Bedoya, G. y V. Núñez, 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica* 153, 215-220.
- Deputy, J.C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M.M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt y J.I. Stiles. 2002. Molecular Markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106, 107-111.
- Farbos, I., J. Veuskens, B. Vyskot, M. Oliveira, S. Hinnisdaels, A. Aghmir, A. Mouras e I. Negrutiu. 1999. Sexual dimorphism in white campion: deletion on the Y chromosome results in a floral asexual phenotype. *Genet.* 151, 1187-1196.
- Filatov, D., F. Monege, I. Negrutiu y D. Charlesworth. 2000. Low variability in a Y-linked plant gene and its implications for Y-chromosome evolution. *Nature* 404, 388-390.
- Filatov, D., V. Laporte, C. Vitte y D. Charlesworth. 2001. DNA diversity in sex-linked and autosomal genes of the plant species *Silene latifolia* and *Silene dioica*. *Mol. Biol. Evol.* 18(8), 1442-1454.
- Gangopadhyay, G., S. Roy, K. Ghose, R. Poddar, T. Bandyopadhyay, D. Basu y K. Mukherjee. 2007. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. *Current Sci.* 92(4), 524-526.
- Kazama, Y. y S. Matsunaga. 2008. The use of repetitive DNA in cytogenetic studies of plant sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 120, 247-254.
- Kim, M.S., P.H. Moore, F. Zee, M.M. Fitch, D.L. Steiger, R.M. Manshardt, R.E. Paull, R.A. Drew, T. Sekioka y R. Ming. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45, 503-512.
- Liu, Z., P. Moore, H. Ma, M. Ackerman, M. Ragilba, Q. Yu, H. Pearl, M. Kim, J. Charlton, J. Stiles, F. Zee, A. Paterson y R. Ming. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427, 348-352.
- Macedo L. G., C. Lacerda y H. Actis. 2002. Identification of sex in *Carica Papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica* 127, 179-184.
- Magdalita, P. y 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, Filipinas.
- Ming, R., P.H. Moore, F. Zee, C.A. Abbey, H. Ma y A.H. Paterson. 2001. Construction and characterization of a papaya BAC library as a foundation for molecular dissection of a tree-fruit genome. *Theor. Appl. Genet.* 102, 892-899.
- Ming, R., J. Wang, P.H. Moore y A.H. Paterson. 2007. Sex chromosomes in flowering plants. *Amer. J. Bot.* 94, 141-150.
- Oliveira, E., J. Loyola, M. Silva, D. Souza, H. Souza y T. Nunues. 2007. Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. *Pes. Agropec. Bras.* 42(12), 1747-1754.
- Parasnis, A.S., W. Ramakrishna, K.V. Chowdari, V.S. Gupta y P.K. Ranjekar. 1999. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor. Appl. Genet.* 99, 1047-1052.
- Sánchez-Betancourt, E. y V. Núñez. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). *Rev. Corpoica* 9(2), 31-36.
- Shunsuke, N., S. Matsunaga, S. Atsushi, K. Tsuneyoshi y S. Kawano. 2002. RAPD isolation of a Y chromosome specific ORF in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Genome* 45, 413-420.
- Storey, W.B. 1953. Genetics of papaya. *J. Heredity* 44, 70-78.
- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano, H. Tanaka, H. Oku, I. Chinen y R. Terauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104, 281-285.
- Villegas, V.N. 1997. *Carica papaya* L. En: Verheij, E.W.M. y R.E. Coronel (eds.). *Edible fruits and nuts. Vol 2.* Wageningen University, The Netherlands.
- Vyskot, B. y R. Hobza. 2004. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends Genet.* 20(9), 432-438.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.G. Lavak, J.A. Raflaski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 19, 6530-6535.