

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PCR DEL SEXO DE LA PAPAYA (*Carica papaya* L.), HÍBRIDO “POCOCÍ”¹

Erica Saalau-Rojas², Walter Barrantes-Santamaría³, Carlos Luis Loría-Quirós³, Arturo Brenes-Angulo²,
Luis Gómez-Alpízar²

RESUMEN

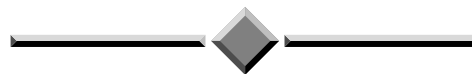
Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido “Pococi”. El objetivo de la presente investigación fue identificar plantas hermafroditas del híbrido de papaya “Pococi”. Para la identificación del sexo de las plantas del híbrido “Pococi”, se utilizó el protocolo descrito por Deputy *et al.* (2002), con algunas modificaciones. Esta metodología emplea un PCR múltiple que permite la amplificación simultánea de dos fragmentos (1.300 y 800 pb respectivamente) para plantas hermafroditas y de un solo fragmento (1.300 pb) para plantas femeninas. El ADN se extrajo a partir de hojas de plantas de invernadero o campo con dos metodologías de extracción, CTAB y lisis alcalina (NaOH). La amplificación por PCR del ADN extraído de muestras foliares de papaya híbrido “Pococi”, con ambos métodos de extracción, produjo los fragmentos del tamaño esperado. La determinación del sexo de 1.500 plántulas en almácigo mostró un 46 % de plántulas hermafroditas y un 54 % de plantas femeninas. La proporción observada de plantas femeninas: hermafroditas no varió de la esperada (1:1) según la prueba de chi-cuadrado ($p=0,4237$). Las plantas hermafroditas fueron llevadas al campo y al momento de la floración se determinó su sexo. La correspondencia entre el sexado por PCR y la expresión sexual en campo fue de un 98 %.

Palabras clave: Plantas hembra, hermafroditas, marcadores moleculares, extracción de ADN, genes ligados al sexo.

ABSTRACT

Sex determination of papaya (*Carica papaya* L.) “Pococi” hybrid by PCR. The objective of this work was to identify papaya hermaphrodite plants of the hybrid “Pococi” at the seedling stage using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Sex identification was achieved according to the methodology described by Deputy *et al.* (2002) with some modifications. This methodology employs a multiplex-PCR assay that allows simultaneous amplification of two fragments (800 bp and 1300 respectively) for hermaphrodite plants and one fragment (1300 bp) for female plants. Genomic DNA was extracted from leaves and two extraction protocols were evaluated, CTAB and rapid alkaline lysis (NaOH). The amplification reaction yielded the expected size of the fragments with both methods of DNA extraction. PCR sex determination of 1500 seedlings yielded 46 % of hermaphrodite and 54 % of female plants. The female: hermaphrodite plant ratio observed did not vary from the expected (1:1) ratio according to the chi-square test ($p = 0.4237$). Hermaphrodite plants were planted in the field in San Carlos region, Costa Rica, and sex was determined at flowering. The correspondence between the PCR sexed plants and sexual expression in the field was 98 %.

Key words: Female plants, hermaphrodites, molecular markers, DNA extraction, sex-linked genes, sex expression.



¹ Recibido: 16 de marzo, 2009. Aceptado: 16 de noviembre, 2009. Proyecto de investigación “Innovación tecnológica en almacigos de papaya” de la Universidad de Costa Rica.

² Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. esaalau@gmail.com, arturo.brenes@ucr.ac.cr, luis.gomezalpizar@ucr.ac.cr

³ Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. walter.barrantes@ucr.ac.cr, clloria@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

La papaya presenta tres tipos de plantas de acuerdo al sexo de las flores que produce: hembras, machos y hermafroditas. Diferentes hipótesis han sido planteadas para explicar la genética de la determinación del sexo en papaya, incluyendo el control por un solo gen con al menos tres alelos, el control por dos genes diferentes, un grupo de genes fuertemente ligados, la presencia de un sistema de cromosomas XY, balance génico de cromosomas sexuales sobre autosomas, elementos reguladores de la vía de desarrollo floral y el control ejercido por dos cromosomas Y levemente diferentes (Y y Y^h) (Hofmeyr 1938, Storey 1938, 1953 y 1976, Sondur *et al.* 1996, Gaurab *et al.* 2007, Ming Yu y Moore 2007, Qingyi *et al.* 2008).

Las plantas con flores hermafroditas son las que producen frutos con las mejores características comerciales: forma alargada y piel gruesa, lo cual les permite resistir más los daños mecánicos en poscosecha y una cavidad interna pequeña, es decir una mayor relación pulpa/semillas (Chaves y Nuñez 2007, Mora y Bogantes 2005). Sin embargo, el sexo de las plantas de papaya solo puede ser determinado hasta que las plantas llegan a la floración (de dos a tres meses). Por lo tanto, para obtener una plantación con plantas mayoritariamente hermafroditas, el productor debe sembrar de tres a cuatro plantas por punto de siembra y eliminar al momento de la floración los fenotipos no deseados (machos y hembras). Esta práctica resulta en un aumento de los costos de producción como consecuencia del mayor número de plántulas sembradas y el mantenimiento de las mismas hasta el momento de ser removidas. Además, requiere de personal capacitado que conozca bien la morfología floral de la papaya y sepa distinguir las flores hermafroditas de las femeninas. Por otro lado, existe siempre el inconveniente de obtener frutas con un menor valor comercial, ya que no siempre se elimina certeramente los genotipos indeseables y la constitución final de la plantación es de un 92 a un 94 % de plantas hermafroditas solamente, y no del 100 % deseado (Mora y Bogantes 2005).

La determinación del sexo de plantas de papaya en etapas tempranas de su desarrollo permite el ahorro de recursos, al facilitar la siembra de plantas 100 % hermafroditas (Parasnis *et al.* 1999). Diferentes estudios han sido conducidos para el establecimiento de un sistema temprano para la determinación del sexo en

papaya. Los mismos incluyen análisis morfológicos, citológicos, isoenzimáticos y de contenido de fenoles (Magdalita y Mercado 2003). Hasta la fecha, ninguno de estos métodos permite determinar el sexo de las plantas de papaya en el estado de plántula o semilla. La mayoría de los sistemas evaluados distinguen plantas hembra de plantas macho pero no de plantas hermafroditas y no son aptos para el análisis de grandes grupos de muestras. Esto ha generado interés por desarrollar estrategias de identificación del sexo en papaya a través de marcadores moleculares, particularmente mediante la aplicación de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés). Varios autores han diseñado iniciadores de PCR a partir de marcadores moleculares que permiten el diagnóstico del sexo de plantas de papaya en estados tempranos de desarrollo (Gill *et al.* 1998, Parasnis *et al.* 2000, Deputy *et al.* 2002, Urasaki *et al.* 2002 a, b, Chaves y Nuñez 2007). Normalmente, el diseño de los imprimadores se basa en la determinación de marcadores RAPDs (Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar) asociados a un tipo sexual. Luego los fragmentos se clonan y se secuencian para generar SCARs (Secuencias Caracterizadas Amplificadas al Azar), y finalmente se emplean las secuencias para diseñar los imprimadores que permiten la amplificación mediante PCR de fragmentos específicos para el tipo sexual. Por lo general es posible distinguir plantas hembra de hermafroditas y masculinas; pero no plantas hermafroditas de masculinas (Deputy *et al.* 2002, Urasaki *et al.* 2002 a,b, Chaves y Nuñez 2007).

El método descrito por Deputy *et al.* (2002) es particularmente útil ya que emplea un PCR múltiple que permite la amplificación simultánea de dos fragmentos (1.300 y 800 pb respectivamente) en plantas hermafrodita y de un solo fragmento (1.300 pb) en plantas femeninas. El fragmento de 1.300 pb es común a ambos sexos, lo que sirve como control interno de la amplificación, obviando los falsos negativos que se presentan en los sistemas que utilizan presencia y ausencia de una sola banda (PCR simple) para la determinación del sexo. La presencia de la banda indica que la planta es femenina y la ausencia que es hermafrodita o viceversa. De manera que si el ADN extraído no es amplificable podrían obtenerse falsos negativos. La ausencia del producto de PCR se debe no a que la planta sea femenina o hermafrodita, sino a que la cantidad o calidad del ADN no fue apropiada para su

amplificación, lo que se obvia con el PCR múltiple (Urasaki *et al.* 2002b).

La aplicabilidad del método de Deputy *et al.* (2002) para la determinación del sexo de plantas de papaya de diferentes genotipos ha sido demostrada en Hawai (Deputy *et al.* 2002) y Filipinas (Magdalita y Mercado 2003). Sin embargo, en Colombia, Chaves y Nuñez (2007) indicaron que el uso de imprimadores de PCR desarrollados a partir de genotipos de papaya de otras localidades falló cuando se aplicaron a genotipos locales y concluyeron que es necesario validar los métodos de sexado de plantas con los materiales locales. En el híbrido "Pococí" la población resultante sigue una relación 1:1 femeninas-hermafroditas. Los machos están ausentes, lo que abre la posibilidad de emplear el método de Deputy *et al.* (2002) para diferenciar entre plantas hermafroditas y hembras de este híbrido en etapas tempranas del desarrollo de las plantas.

El presente trabajo tuvo como objetivos: 1) validar el método de Deputy *et al.* (2002) para la determinación de sexo en plantas de papaya del híbrido "Pococí"; 2) comparar dos métodos de extracción de ADN, CTAB (Rogers y Bendlich 1988) y NaOH (GE Healthcare 2005), con el propósito de disminuir el tiempo necesario para procesar una muestra y 3) establecer la concordancia entre la determinación del sexo por PCR y la morfología floral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron hojas de 1500 plántulas de invernadero de tres semanas de edad y de 146 plantas en estado de pre floración en el campo del híbrido "Pococí". Ambos materiales provinieron de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEFBM) en Alajuela, Costa Rica en el año 2007.

La extracción de ADN se efectuó en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA).

1. Extracción del ADN con CTAB

Para la extracción de ADN con CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio) se siguió el método descrito por Rogers y Bendlich (1988), con algunas modificaciones.

Secciones de hoja de 1 cm² de tamaño se colocaron en un tubo Eppendorf plástico de 1,5 ml. Luego se agregó nitrógeno líquido y se maceró el tejido con la ayuda de un taladro manual al que se le colocó un pistilo plástico. Al macerado resultante se adicionaron 300 µl de amortiguador de extracción CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 0.2M, 0.05M EDTA, 2.0M NaCl) y la mezcla se incubó a 65 °C por 30 min. Posteriormente se agregaron 300 µL de cloroformo-fenol-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló suavemente por inversión. Para separar las fases se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf. Se repitió la extracción orgánica con cloroformo-fenol-alcohol isoamílico y se recuperó la fase acuosa, a la que se le agregaron 20 µl de NaOAc 3,0 M (pH 5,2) y 300 µl de isopropanol frío, para la precipitación del ADN. La mezcla se dejó reposar a -20 °C durante la noche. Luego se centrifugó por 15 min a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 70 µl de etanol frío al 70 % y se centrifugó durante 5 min (cada vez) a 13.000 rpm. El precipitado final se secó en una cámara de flujo laminar y se rehidrató en 40 µL de agua doble destilada-doble autoclavada. Posteriormente se preparó una dilución 1:10 en agua para su uso en PCR. La calidad y rendimiento del ADN genómico se determinó en un gel de agarosa al 1 % corrido en TBE 0.5X (Tris 10 mM, Borato 20 mM, EDTA 1,0 mM) y teñido con bromuro de etidio.

2. Extracción de ADN con NaOH

Al igual que en el método anterior, se colocaron secciones de hoja de 1 cm² en tubos Eppendorf plásticos de 1,5 ml. Según la metodología descrita por GE Healthcare (2005), se agregaron 150 µl de NaOH 0,25 M con 0,1 % Tween 20 v/v a cada tubo y se maceró cada muestra con la ayuda de un taladro manual al que se le colocó un pistilo plástico. Al macerado resultante se adicionaron 150 µl de solución neutralizadora (80 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,0 mM EDTA) y la mezcla se incubó a 70 °C durante 30 min. Para separar las fases se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Esta se diluyó en agua en una relación 1:25 para su uso en el PCR. La calidad y rendimiento del ADN genómico extraído se determinó de la misma manera que con el método de extracción CTAB.

