

Identificación mediante PCR del sexo de plantas de *Carica papaya* L. variedad 'Maradol Roja' obtenidas vía embriogénesis somática

Laisyn Posada-Pérez*, Rafael Gómez-Kosky, Milady León, Luis Rojas, Yenny Padrón. *Autora para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. CP 54 830. Villa Clara. Cuba. e-mail: laisyn@ibp.co.cu

RESUMEN

Para la identificación molecular del sexo de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) se han empleado plantas cultivadas en campo, sin embargo no se ha determinado en plantas *in vitro*. El objetivo de la presente investigación fue identificar plantas hermafroditas de papaya var. 'Maradol Roja' obtenidas vía embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros. Para ello, se empleó un PCR múltiple que permite la amplificación simultánea de dos fragmentos (1300 y 800 pb) para plantas hermafroditas y de un solo fragmento (1300 pb) para plantas femeninas. El ADN se extrajo a partir de hojas de plantas *in vitro* mediante lisis alcalina con NaOH. La amplificación por PCR del ADN extraído de muestras foliares, produjo los fragmentos del tamaño esperado. En 20 líneas de plantas de papaya regeneradas por embriogénesis somática se logró diferenciar plantas hermafroditas y plantas femeninas. Este es el primer informe sobre la determinación del sexo en plantas obtenidas por embriogénesis somática en la variedad 'Maradol Roja'.

Palabras clave: embriones cigóticos, PCR múltiple, plantas hermafroditas

Sex determination by PCR in *Carica papaya* L. plants obtained via somatic embryogenesis

ABSTRACT

For the molecular identification of the sex of papaya plants (*Carica papaya* L.) have been used in field crop plants, however it has not been determined *in vitro* plants. The objective of this research was to identify hermaphrodite papaya plants var. 'Maradol Red' obtained via somatic embryogenesis from immature zygotic embryos. For this, a multiplex PCR enables simultaneous amplification of two fragments (1300 and 800 bp) for hermaphrodite and one fragment (1300 bp) to female plants was used. DNA was extracted from leaves of *in vitro* plants by alkaline lysis with NaOH. PCR amplification of DNA extracted from leaf samples, produced fragments of the expected size. In 20 papaya plants lines regenerated through somatic embryogenesis it was achieved differentiate hermaphrodite plants and female plants. This is the first report on sex determination in plants obtained by somatic embryogenesis in the variety 'Red Maradol'.

Key words: hermaphrodite plants, multiple PCR, zygotic embryos

INTRODUCCION

La papaya (*Carica papaya* L.) presenta tres tipos de plantas de acuerdo con el sexo de las flores que produce: femeninas, masculinas y hermafroditas. Las plantas con flores hermafroditas son las que producen frutos con las mejores características comerciales. La determinación del sexo de plantas de papaya en edades tempranas de su desarrollo permite el ahorro de recursos, al facilitar la siembra de plantas 100% hermafroditas.

La segregación sexual en la papaya se explica con un modelo de un locus con tres alelos: M,

masculino; M^f hermafrodita; y m femenina, con los alelos M y M^f dominantes sobre m . Las femeninas (mm) son homocigóticas recesivas. Los masculinos (Mm) y hermafroditas (M^fm) son heterocigóticos. Las plantas hermafroditas típicamente producen 25% de semillas no viables en sus frutos, porque todas las combinaciones de dos alelos dominantes (MM , MM^f y M^fM) son embriogénicamente letales. Aunque este modelo explica de forma satisfactoria las frecuencias de segregación típicas en papaya, la determinación del sexo es más compleja, y se ha revelado la presencia de un par de cromosomas sexuales primitivos (Urasaki *et al.*, 2012).

En la variedad 'Maradol Roja' persisten casi exclusivamente las formas femenina y hermafrodita, mientras que los machos son prácticamente ausentes. Para obtener una plantación con individuos hermafroditas, el productor de papaya debe sembrar tres plantas por punto de siembra y eliminar al momento de la floración los fenotipos no deseados. Esta práctica resulta en un aumento de los costos de producción como consecuencia del mayor número de plántulas sembradas y su mantenimiento hasta el momento de ser removidas (Saalau-Rojas *et al.*, 2009).

Para la determinación del sexo de plantas de papaya se han utilizado marcadores SCAR (región amplificada con secuencia caracterizada). Este tipo de marcador consiste en un fragmento de ADN genómico identificado con amplificación vía 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).

Para la determinación del sexo en *C. papaya* se han empleado plantas cultivadas en campo, sin embargo, no se ha utilizado en plantas cultivadas *in vitro*. El objetivo de la presente investigación fue identificar plantas hermafroditas de la variedad de papaya 'Maradol Roja' obtenidas vía embriogénesis somática mediante análisis de PCR.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se emplearon fragmentos de hojas de 20 líneas de plantas *in vitro* provenientes del medio de cultivo de crecimiento (Posada-Pérez *et al.*, 2007) (Figura 1). Por cada línea se utilizó una planta.

Extracción del ADN

A las plantas *in vitro* de papaya se les realizó la extracción de ADN genómico a través del método de lisis alcalina *in situ* propuesto por Xin *et al.* (2003). Inicialmente se tomaron segmentos de 5.0 mm² de tejido y se les añadió 50 µl del tampón A (150 mM NaOH, 2% Tween 20). Las muestras se incubaron durante 10 min a 95°C, se les añadió 50 µl del tampón B (150 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) y se mezclaron moderadamente. Para la reacción de PCR se tomaron 2 µl del extracto.

Determinación del sexo mediante PCR múltiple

La reacción de amplificación se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Deputy *et al.* (2002) que emplea un PCR múltiple que permite la amplificación simultánea de dos fragmentos (1300 y 800 pb respectivamente) en plantas hermafroditas y de un solo fragmento (1300 pb) en plantas femeninas. El fragmento de 1300 pb es común a ambos

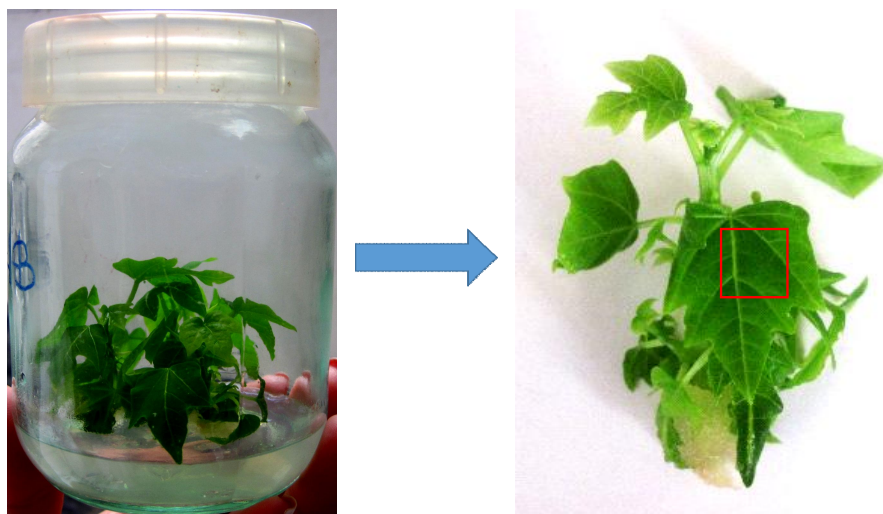


Figura 1. Planta *in vitro* de *C. papaya* utilizada como material vegetal para la determinación del sexo.

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 amplificación fue realizada en un volumen de reacción final de 25 µl, que contenía 2 µl de la mezcla de ADN genómico. Se utilizó el kit *TopTaq DNA Polymerase* de Qiagen (USA). Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en el equipo de control térmico programable Mastercycler (Eppendorf, Alemania). La secuencia de reacciones para amplificación del fragmento del gen *Sex 1* comenzó con 2 min de desnaturalización a 94°C, seguida por 35 ciclos del bloque siguiente: 94°C por 30 s, 64°C por 30 s y 72°C por 2 min. Luego se realizó un paso final de extensión a 72°C por 10 min.

Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis a 100 V durante 40 min en gel de agarosa al 1.5% (m/v) con tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x (0.09 M Tris-borato, 0.002 M EDTA, pH 8). Como marcador de peso molecular se usó el *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* (Fermenta, Lituania). Luego se realizó la tinción con 5.0 µg l⁻¹ de

bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001) por 10 min y se observó en un transiluminador *MacroVue* (Pharmacia LKB) mediante la incidencia de luz ultravioleta (UV).

Se emplearon los siguientes cebadores:

W11

5'-CTGATGCGTGTGTGGCTCTA-3' F

5'-CTGATGCGTGATCATCTACT-3' R

T1

5'-TGCTCTTGATATGCTCTCTG-3' F

5'-TACCTTCGCTCACCTCTGCA-3' R

Se realizó un gradiente para determinar la temperatura óptima de hibridación de los cebadores empleados desde 55°C hasta 68°C. Como marcador de peso molecular se usó el *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* (Fermenta, Lituania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN extraído resultó adecuado para su amplificación en un PCR múltiple. Los fragmentos obtenidos fueron del tamaño esperado, 1300 pb para la combinación de cebadores T1-F/T1-R y 800 pb para la combinación W11-F/W11-R. Las plantas hermafroditas presentaron el patrón de dos bandas, 1300 y 800 pb respectivamente, mientras que en las plantas femeninas se observó un patrón de una banda de 1300 pb (Figura 2).

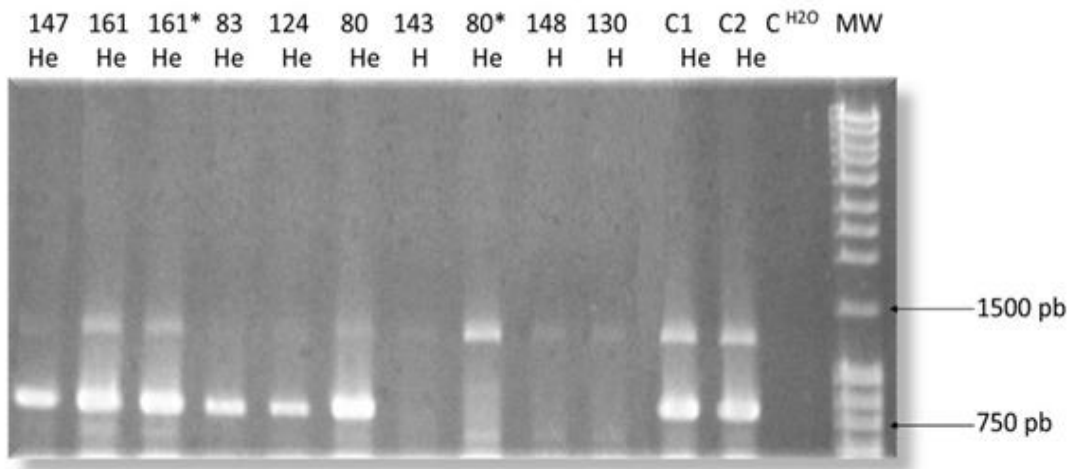


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Visualización de las bandas correspondientes de las plantas *in vitro* de *C. papaya* hermafroditas (He) y femeninas (H) amplificadas con la combinación de los cebadores T1/W11 a la temperatura establecida por el protocolo (58°C).

El empleo de PCR para determinar el sexo en papaya con imprimadores derivados de marcadores RAPDs ligados al gen Sex 1 (Deputy *et al.*, 2002), permitió la diferenciación de plantas hermafroditas y femeninas de las plantas *in vitro* de papaya de la variedad 'Maradol Roja'. Estos resultados coinciden con los obtenidos en Hawai (Deputy *et al.*, 2002) y en Filipinas (Magdalita y Mercado, 2003). En Colombia, sin embargo, Chaves-Bedoya. (2009) indicaron que el método no fue aplicable a los genotipos de papaya cultivados en ese país.

El gradiente de PCR mostró que la temperatura óptima de hibridación de los cebadores empleados fue de 61°C (Figura 3).

Esta temperatura difiere de la establecida en el programa de PCR utilizado por Deputy *et al.* (2002). Con la temperatura óptima (61 °C), se obtuvo una mayor concentración en las bandas amplificadas (Figura 4).

La técnica permite determinar el sexo de las plantas en estados tempranos del desarrollo (plantas *in vitro*) y sería útil para establecer plantaciones comerciales con solo plantas

hermafroditas, particularmente cuando la producción se destina a la exportación.

La utilización de técnicas moleculares representa un costo directo para los productores y para quienes se dedican a la producción de papaya.

Su implementación dentro del sistema de producción comercial de papaya dependerá de la relación costo/beneficio resultante de establecer plantaciones con mayores rendimientos comerciales (solo hermafroditas) en relación a la reducción de los costos indirectos, como la inversión de recursos y tiempo para el mantenimiento de plantas femeninas no deseadas.

La técnica de PCR empleada para la determinación de sexo en papaya tiene también aplicación dentro de los programas de mejora genética del cultivo, para la determinación del sexo de las líneas utilizadas como padres en los cruzamientos para la obtención de híbridos y en la propagación *in vitro*, para evaluar la estabilidad de las líneas hermafroditas producidas mediante esta técnica.

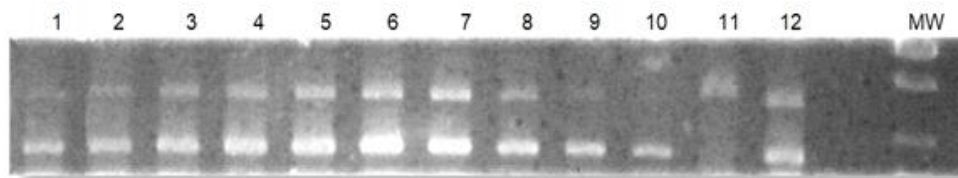


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Visualización del gradiente de PCR para determinar la temperatura óptima de hibridación de los cebadores empleados para la determinación del sexo de las plantas de papaya. 1-55,9°C; 2-56,1°C; 3-56,8°C; 4-58,0°C; 5-59,4°C; 6-61,0°C; 7-62,5°C; 8-64,1°C; 9-65,6°C; 10-66,8°C; 11-67,6°C; 12-68,0°C. MW- marcador de peso molecular.

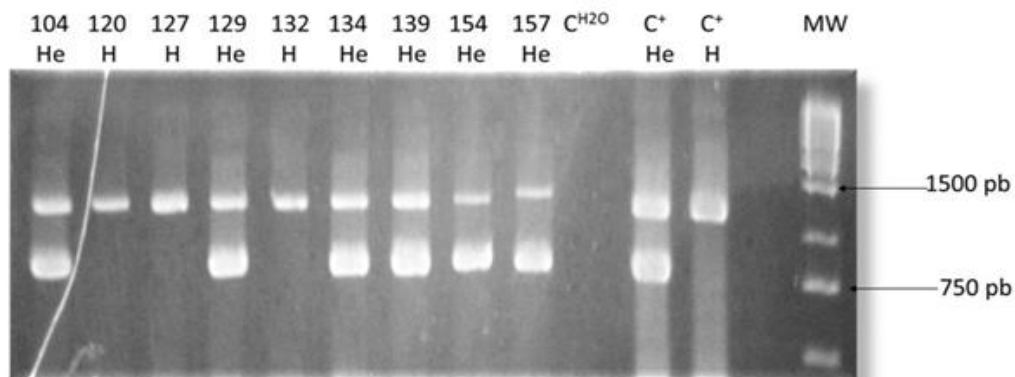


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Visualización de las bandas correspondientes de las plantas *in vitro* de *C. papaya* hermafroditas (He) y femeninas (H) amplificadas con la combinación de los cebadores T1/W11 a la temperatura obtenida en el gradiente de PCR (61°C).

CONCLUSIONES

Al usar los marcadores SCAR T1 y W11 en una PCR múltiple se logró diferenciar plantas femeninas de hermafroditas empleando ADN de plantas obtenidas por cultivo de tejido. Estos constituyen los primeros resultados de estudios de identificación del sexo en plantas de papaya var 'Maradol Roja' propagadas *in vitro* vía embriogénesis somática.

REFERENCIAS

Chaves-Bedoya G, M Pulido, E Sánchez-Betancourt, V Núñez (2009) Marcadores RAPD para la identificación del sexo en papaya (*Carica papaya* L.) en Colombia. *Agronomía Colombiana* 27:145-149

Deputy J C, R Ming, H Ma, Z Liu, M M Fitch, M Wang, R Manshardt, J I Stiles (2002) Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106:107-111

Magdalita PM, Mercado, CP (2003) Determination the sex of papaya for improved produced. *Bull. Food Fert. Tech. Centre. Manila*

Posada-Pérez Laisyn, Rafael G Kosky, Maritza Reyes (2007) Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. *Biotecnología Vegetal* 7 (3): 131 – 138

Saalau-Rojas E, W Barrantes-Santamaría, C L Loría-Quirós, A Brenes-Angulo, L Gómez-Alpizar (2009) Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido Pococí. *Agronomía Mesoamericana* 20:311-317

Semagn K, A Bjornstad, M N Ndjiondjop (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5:2540-2568

Urasaki N, K Tarora, A Shudo, H Ueno, M Tamaki, N Miyagi, S Adaniya, H Matsumura (2012) Digital transcriptome analysis of putative sex-determination genes in papaya (*Carica papaya*). *PLoS ONE* 7:e40904

Xin Zhanguo, Jeff PV, Melvin JO, John JB (2003) High-Throughput DNA Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques* 34: 820-826

Recibido: 15-07-2014

Aceptado: 24-10-2014