

Ensayos

Evaluación de marcadores moleculares en la predicción temprana de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) de tipo hermafrodita *var.* maradol en la zona Costa de Oaxaca

Francisco Gumaro Ruiz Ruiz¹, Julieta Karina Cruz Vázquez¹, José Luis Anaya López², Ana Paulina Rodríguez Vera

¹ Universidad del Mar Campus Puerto Escondido, ²INIFAP-Bajío

Recibido: 10-02-2016 Aceptado: 31-01-2017

Resumen

En el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) de la región Costa de Oaxaca, es necesario realizar la actividad del sexado a la planta a los tres meses de edad, tiempo aproximado que alcanza la etapa de floración, que consiste en determinar el sexo de cada planta por la morfología interna de la flor y seleccionar solamente a las plantas hermafroditas, desechando a las femeninas y masculinas. Esto debido a los frutos que provienen de las plantas hermafroditas son los de mayor valor comercial. Dicha actividad desencadena pérdidas económicas al productor generadas por la manutención durante tres meses de las plantas desechadas. El objetivo de este trabajo fue realizar el sexado de plántulas de papaya *var.* maradol sin necesidad de llegar a la etapa de floración, para lograrlo se usaron los marcadores moleculares T1, T12 y W11 para la identificación temprana de plantas hermafroditas. Se evaluó el porcentaje de su predicción y el costo de la herramienta molecular. Se determinó que el uso de estos marcadores moleculares representan una confiabilidad del 100% en su aplicación en la variedad maradol y un costo aproximado de 45.76 pesos por el sexado de cada planta.

Palabras clave: Amplificación, secuencia, marcador.

Abstract

In the coastal region of Oaxaca, it is necessary to determine the gender of the papaya (*Carica papaya* L.) plant after three months when blooming takes place. This process consists of determining the plant's sex based on the flower's internal morphology and by choosing only hermaphrodite plants, discarding male and female only plants, as fruit from hermaphrodite plants have a higher commercial value. This activity results in economic losses for producers due to the investment required to maintain the plants for a period of three months which are later discarded. The objective of this work was to determine the gender of the papaya plant for the Papaya-Maradol before the blooming phase. In order to achieve this, molecular markers T1, T12 and W11 were used for early identification of hermaphrodite plants. Prediction percentage and cost of the molecular tool were evaluated. It was concluded that use of the molecular markers was 100% reliable for the Papaya-Maradol and an approximate cost of 46 pesos per gender determination of each plant was determined.

Keywords: Amplification, sequence, marker.

Résumé

Pour la culture de la papaye (*Carica papaya* L.) de la région côtière de Oaxaca, il est nécessaire de déterminer le sexe de la plante à 3 mois, temps approximatif pour arriver à l'étape de floraison. Cela consiste à déterminer le sexe de chaque plante grâce à la morphologie interne de la fleur pour sélectionner uniquement les plantes hermaphrodites et jeter les plantes mâles et femelles. En effet, les fruits provenant des plantes hermaphrodites sont de meilleure valeur commerciale. Cette activité provoque des pertes économiques pour le producteur, pertes générées par l'entretien durant trois mois des plantes qui seront finalement jetées. L'objectif de ce travail est de déterminer le sexe des plantules de papaye *var.* maradol sans devoir attendre l'étape de floraison, pour cela on a utilisé les marqueurs moléculaires T1, T12 et W11 pour l'identification précoce des plantes hermaphrodites. On a évalué le pourcentage de prédiction et de coût de la recherche moléculaire. On a déterminé que l'utilisation de ces marqueurs moléculaires représente une fiabilité de 100% pour son application sur la variété maradol avec un coût approximatif de 45.76 pesos par plante pour la détermination du sexe.

Mots-clés: Amplification, séquence, marqueur.

Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) es un cultivo tropical que produce frutos ricos en vitaminas (Gschwend, Yu, Moore, Sasaki, Chen, Wang, Na, Ming, 2011). Presenta una etapa juvenil muy corta, con florecimiento en todo el año. Pertenece a la familia Caricaceae que

incluye 6 géneros y 35 especies, de las cuales 32 son dioicas, dos son trioicas y solamente una monoica (Ming, Yu, Moore, 2007). Diploide con nueve pares de cromosomas y un genoma de 372 Mb (Devitt, Sawbridge, Holton, Mitchelson, Dietzgen, 2006). La papaya

posee un cromosoma primitivo Y, con una región específica masculina que representa sólo alrededor del 10% del cromosoma (Liu, Moore, Ma, Ackerman, Raglba, Yu, Pearl, Kim, Stiles, Zee, Paterson, Ming, 2004).

Las plantas de papaya presentan tres formas sexuales claramente diferenciadas, las hermafroditas, femeninas y masculinas. Las flores masculinas se encuentran agrupadas en largos racimos de color amarillo, de 2 a 4 cm de largo con pétalos fusionados para formar un tubo largo, con 10 estambres fértiles y un ovario rudimentario. En cambio las flores femeninas forman pequeños grupos que se ubican en las axilas de las hojas, son más grandes, por lo general de color blanco o crema, con cinco pétalos libres y un ovario con cinco estigmas en forma de abanico sin estambres; por otro lado las flores hermafroditas tienen de cinco a diez estambres y un ovario prominente (Chaves y Nuñez 2007), (Reddy, Krishna, Reddy 2012). Dichas morfologías son mostradas en la figura 7.

Los productores de papaya de la Costa de Oaxaca para lograr dividendos positivos a partir de esta actividad agrícola, deben de realizar diversas inversiones como en cualquier otro cultivo que son: compra de terreno, adquisición de la planta, fertilización, aplicación de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades, el pago de servicios a jornaleros, agua, luz y maquinaria (Jimenez 2002). Además de lo anterior los productores deben de realizar el escrutinio o “sexado” en cada planta de papaya a los tres meses de edad, tiempo aproximado que alcanza la etapa de floración (Reddy et al., 2012). En la actividad del “sexado” se verifica la morfología interna de la flor para poder identificar a las plantas de tipo sexual hermafrodita y desechar las plantas femeninas que desarrollarán frutos de bajo valor comercial (Ming, Yu, Moore, 2007). Las plantas del tipo femenino al ser desechadas generan irremediables pérdidas económicas debida a su manutención por tres meses aproximadamente, que podrían ser excluidos si se pudiera determinar el sexo de las plantas de manera temprana y precisa antes de ser transplantadas al campo (Sánchez y Nuñez 2008), (Reddy et al., 2012). Los frutos de plantas hermafroditas, poseen características agronómicas superiores con respecto a los frutos provenientes de las femeninas, una mayor cantidad de pulpa, elevado contenido de azúcares,

mejor sabor, mayor dureza de corteza que le confiere mayor resistencia a enfermedades, su forma alargada promueve mejores ventajas en el empaque (Aspeitia, Torres, Mendoza, Reyes, 2014), (Zeng, Yu, Hou, Moore, Alam, Ming, 2014), (Urasaki, Tarora, Shudo, Ueno, Tamaki, Miyagi, Adaniya, Matsumura 2012).

Sistema marcadores moleculares tipo SCAR

La determinación del sexo en las plantas de papaya consistió en el diseño de iniciadores tipo SCAR (Región Secuenciada Caracterizada y Amplificada) por sus siglas en inglés SCAR “Sequence Characterized Amplified Region” deducidos de una secuencia del producto de la

amplificación aleatoria de DNA polimórfico (por sus siglas en inglés RAPD Random Amplification of Polymorphic DNA) (Deputy, Ming, Ma, Liu, Fitch, Wang, Manshardt, Stiles, 2002). Dichos autores reportaron tres marcadores tipo SCAR específicos para el “sexado”, posteriormente clonaron tres productos RAPD-PCR que mostraron vinculación al gen que determina el sexo, Sex1 en papaya denominados T11, T12 y W11, los probaron en un ensayo con el sistema de iniciadores (T1-T12) y (T1-W11) con diferentes variedades de cultivos Hawaianos de papaya “Kapoho”, “Sunrise”, todas las plántulas analizadas con este sistema de iniciadores fueron “sexadas” con una predicción del 100%. Estos mismos autores realizaron otro ensayo con el mismo sistema pero con setecientos cincuenta plantas, la predicción del porcentaje de hermafroditas con el uso de estos marcadores fue del 100%, pero no fue así, la validación real en campo fue del 99.2%. Esto quiere decir que 744 plantas fueron hermafroditas y seis plantas resultaron ser de tipo femenino Deputy et al., (2002). El resultado positivo para identificar las plantas hermafroditas consiste en dos bandas de 1,300 pb y 800 pb derivado del sistema de iniciadores (T1-T12), o (T1-W11) y para las femeninas solamente una banda de 1,300 pb procedente del oligo T1, cabe resaltar que la pareja de iniciadores T1 pueden ser usados también como control positivo en las reacciones de amplificación debido a que presentan señal de amplificación tanto en las plantas hermafroditas como en femeninas, por otra parte, el par de iniciadores T12 al

igual que los W11 amplifican un fragmento exclusivo para plantas hermafroditas de aproximadamente 800 pb por lo tanto sirven como un sistema de selección o discriminación entre dichas morfologías sexuales, tal como lo indica la tabla 1.

Investigaciones con marcadores SCAR

Trabajos relacionados al “sexado” de las plantas de papaya han usado los marcadores moleculares diseñados por Deputy et al., (2002) entre los que podemos mencionar a Aspeitia et al., (2014) los cuales reportaron la identificación de hermafroditas en plantas de papaya variedad “Maradol” con los iniciadores T1, el desempeño de juego de oligos T1 fue inconsistente al no amplificar la banda esperada de 1,300 pb en las plantas femeninas, por otro lado la amplificación realizada por los iniciadores T12 y W11 se comportaron según lo reportado por Deputy et al., (2002). Por lo tanto concluyeron que el sistema de iniciadores T1 no pueden ser usados en esta variedad.

Trabajos similares realizados por Chaturvedi, Bommisetty, Pattanaik, Chinnaiyan, Ramachandra, Chennareddy, (2014) usaron los iniciadores W11 en la determinación sexual de variedades de papaya dioicas, ginodioicas y de 84 plántulas provenientes de una cruce de *Carica papaya* y *Vasconcellea cauliflora*. Los resultados fueron consistentes de acuerdo a lo Tabla 1. Secuencias de los marcadores moleculares en la diferenciación de plantas de papaya de tipo sexual hermafrodita. Fuente Deputy et al., (2002). reportado por Deputy et al., (2002). Otros investigadores realizaron algunas modificaciones al sistema de iniciadores reportados por Deputy et al., (2002). Utilizando el software Primer Explorer versión 4.0 (Primer Explorer, 2016). Generaron oligos tipo LAMP por sus siglas en inglés (Loop Mediated Isothermal Amplification). LAMP es una nueva técnica de amplificación de ácidos nucleicos basado en la fluorescencia o turbidez

de la mezcla de reacción contenida en el tubo microcentrífuga, omitiendo de esta manera realizar la electroforesis en gel de agarosa para detectar los productos amplificados (Notomi, Okayama, Masubuchi, Yonekawa, Watanabe, Amino, Hase, 2000), Ellos reportaron el diseño de seis oligos para ser aplicados a esta tecnología, dos de ellos los nombraron (W11-LAMP, T12- LAMP). Su construcción fue a partir de la secuencia de los iniciadores propuestos por Deputy et al., (2002). La predicción de estos dos iniciadores-LAMP fue sobresaliente con respecto a los cuatro oligos restantes (Hsu, Gwo, Lin, 2012).

En una investigación realizada en Costa Rica utilizaron los iniciadores descritos por Deputy et al., (2002). En este trabajo realizaron el análisis de 1,500 plántulas de invernadero y 146 plantas en estado de prefloración del híbrido “Pococi” con una predicción del 96% para plantas adultas y 98% en plántulas (Saalau, Santamaría, Loría, Brenes, Gómez, 2009).

En otra investigación realizada en Colombia se evaluó la efectividad de los marcadores diseñados por Deputy et al., (2002). La cual consistió en 52 plantas de las cuales 24 fueron plantas en estado de floración y 28 sin flores además se incluyeron tres especies de papayuela (*Vasconcella* spp.). Los resultados son los esperados según lo reportado por Deputy et al., (2002), en que los iniciadores T1 (control+) amplifican para plantas hembras, hermafroditas y machos con una banda de 1,300 pb. Para el caso del sistema de iniciadores W11 se observó la amplificación de un fragmento de 800 pb solamente para plantas macho y hermafroditas (Sánchez y Nuñez 2008), este resultado es debido a que la papaya contiene un cromosoma Y primitivo, en donde la planta hermafrodita y masculina comparten secuencias idénticas en la mayoría de las partes de la región específica masculina (MSY) (Liu et al., 2004).

Tabla 1. Secuencias de los marcadores moleculares en la diferenciación de plantas de papaya de tipo sexual hermafrodita Fuente Deputy et al., (2002).

	Nombre del iniciador	Secuencia (5'-----3')	Tamaño fragmento	Identifica
T1	<i>T1-F Sentido</i>	TGCTCTGATAATGCTCTCTG	1,300 pb	Control (+)
	<i>T1-R Antisentido</i>	TACCTTCGCTACCTCTGCA		
T12	<i>T12-F Sentido</i>	GGGTGTGTAGGCACTCTCCTT	800 pb	Hermafrodita
	<i>T12-R Antisentido</i>	GGGTGTGTAGCATGCATGATA		
W11	<i>W11-F Sentido</i>	CTGATGCGTGTGTGGCTCTA	800 pb	Hermafrodita
	<i>W11-R Antisentido</i>	CTGATGCGTGATCATCTACT		

Investigaciones con otros marcadores moleculares

Investigación realizada por Urasaki, Tokumoto, Tarora, Ban, Kayano, Tanaka, Oku, Chinen, Terauchi, (2002).

Analizaron dos variedades Hawaianas económicamente importantes de papaya “Sunrise Solo”, “Waimanalo Solo” Reportaron el uso de marcadores específicos tipo SCAR derivados de secuencias RAPD generados a partir de 25 decámeros. El oligo IBRCRP07 (5´-TTGGCACGGG-3´) fue capaz de diferenciar las plantas de papaya de tipo masculino y hermafrodita.

Otro trabajo realizado en Brasil por Lemos, Soares, Zaidan, (2002) aplicados a las variedades “Baixinho de Sanata Amália”, “Sunrise Solo” y “Sunrise Solo 72/12” usaron los marcadores moleculares tipo RAPD provenientes de 152 oligos. El decámero BC210 (5´-GCA CCG AGA G-3´) generó una banda de 438 pb (BC210438) exclusivamente en plantas hermafroditas. Siendo una buena herramienta de “sexado” para estas variedades.

Del mismo modo Chaves y Nuñez (2007) Realizaron un estudio en diversos cultivares de Colombia. El trabajo se realizó con las variedades “Catira” desarrollado por el Instituto Colombiano de Agricultura, “ILS 647” e “ILS 649”. Para determinar el sexo en plantas de papaya, optaron también por los marcadores moleculares RAPD, pero a diferencia del estudio realizado en Brasil consistió en un decámero identificado como OP-Y7 (5´-AGAGCCGTCA-3´) que era capaz de diferenciar el tipo sexual de las tres variedades analizadas, este marcador generó una banda de aproximadamente 900 pb (OP-Y7900) que sólo estaba presente en plantas masculinas pero no en hermafroditas ni femeninas, con análisis posteriores, se diseñaron marcadores tipo SCAR derivados del fragmento OP-Y7900 con el procedimiento reportado por Deputy et al., (2002).

Brasil y Costa Rica son algunos de los principales países productores de papaya (FAOSTAT, 2014); Actualmente ya han realizado estudios en la identificación temprana de plantas de papaya de tipo hermafrodita usando diversos marcadores moleculares tipo SCAR o RAPD. Por otro lado México se encuentra en los principales países productores (figura 1). Ocupó el cuarto lugar en el rendimiento de la producción de papaya a nivel mundial con 494,744 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014). Siendo el estado de Oaxaca, en el 2014 el primer lugar de producción a nivel nacional con una

producción de 274,525.40 toneladas, donde la región Costa se destacó como la principal zona productora de papaya con 260,114 toneladas como se muestra en la figura 2 y 3 (SIAP, 2015).

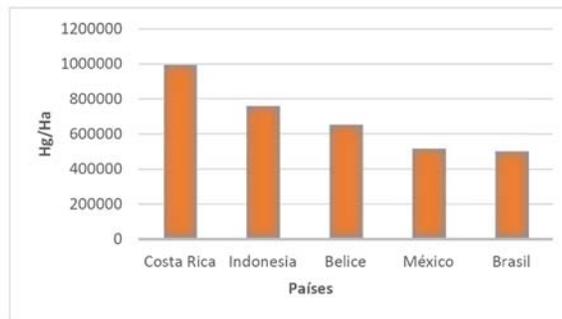


Figura 1. Países que obtuvieron el mayor rendimiento en la producción de papaya a nivel mundial en el periodo 2013-2014. Fuente (FAOSTAT, 2014).

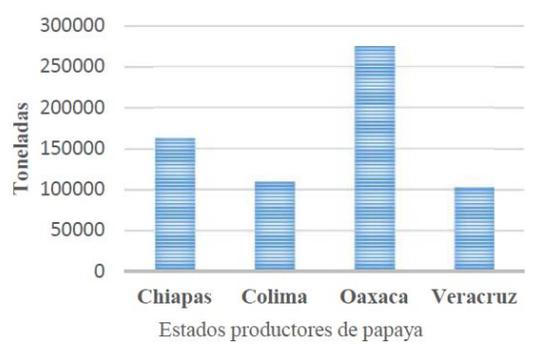


Figura 2. Estados que mostraron la mayor producción de papaya en el 2015. Fuente (SIAP, 2015)

Dada la importancia de esta zona tropical en cuanto a la producción de este fruto y aunado que no se ha hecho alguna investigación de esta naturaleza en la región, resulta interesante conocer el desempeño de los marcadores moleculares tipo SCAR en la variedad maradol cultivada en la región Costa. Para que en un futuro pueda ser adoptada como una herramienta de identificación temprana de plantas hermafroditas por los productores de esta región.

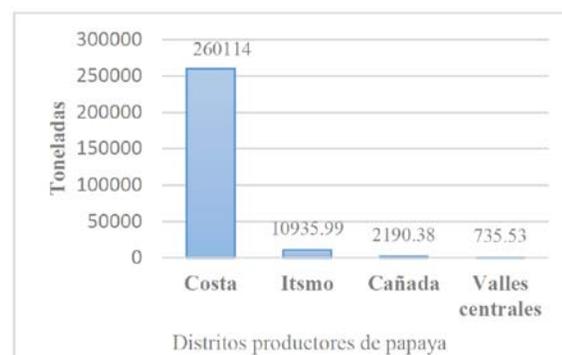


Figura 3. Distritos del estado de Oaxaca que mostraron la mayor producción de papaya en el 2015. Fuente (SIAP, 2015).

Para lograrlo se plantearon los siguientes objetivos en el presente trabajo de investigación: Analizar el comportamiento de los marcadores moleculares desarrollados por Deputy et al., (2002) en la predicción oportuna de plántulas hermafroditas variedad maradol de la región Costa de Oaxaca, y determinar el costo de la herramienta molecular para realizar el “sexado” por planta de papaya.

Materiales

El material vegetal fue colectado en el año 2015, que consistió en seleccionar una hoja por plántula. Se hicieron tres colectas en cultivos de papaya variedad maradol en San José Río Verde, La Boquilla; Municipio de Santiago Jamiltepec del Estado de Oaxaca. En la primer colecta se analizaron 150 plantas de 45 días de edad (latitud:16.056068, longitud:- 97.801314). En la segunda colecta se seleccionaron 78 plántulas de 15 días de edad (latitud: 16.128255, longitud: -97.753914). La tercer colecta consistió en la búsqueda de diversas morfologías florales en cultivos en etapa de floración (latitud:16.133336, longitud: - 97.759472).

Metodología

El “sexado” a nivel molecular de las hojas seleccionadas consistió en varias etapas: 1. Secado de material vegetal. 2. Extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA). 3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa para verificar la calidad del DNA. 4. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple). 5. Electroforesis horizontal en gel de agarosa para verificar los productos de amplificación.

Secado de material vegetal

Para esta etapa se usó papel seda (Che Scientific®), bolsa plástica con cierre hermético (Ziploc®), silica gel (Camen®). Las hojas se lavaron con agua des-

tilada estéril y secaron con papel absorbente, cada hoja fue depositada en un sobre hecho de papel seda, posteriormente el sobre se introdujo en la bolsa de plástico conteniendo en su interior 20 gramos de silica gel. Todas las hojas fueron deshidratadas por dos días, tiempo necesario para que el tejido estuviera completamente seco.

Extracción de ácidos nucleicos

En esta etapa se realizó el protocolo reportado por Porebski, Grant, Bernard, (1997) con algunas modificaciones. En la solución de extracción se usó el detergente Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con las siguientes concentraciones CTAB 2 %, EDTA 35 mM, NaCl 2.5 M, Tris-HCl pH 8.0 150 mM (Sigma-Aldrich). Se utilizó 1.0 cm² de tejido deshidratado, se colocó en el interior de un tubo microcentrífuga y se molió con la ayuda de un pistilo de polipropileno. Para la solución de lavado se usó cloroformo-octanol (Meyer®) con una proporción 24:1. En la precipitación del DNA se realizó añadiendo acetato de amonio 7.4 M (Meyer®) con etanol absoluto (Meyer®) y se dejó a -20 °C por 2 horas. Transcurrido el tiempo se lavó la pastilla que contiene el DNA genómico con etanol al 70% (v/v). El alcohol se decantó y la pastilla se disolvió con 100 µL de agua destilada estéril, se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

Electroforesis de DNA genómico

Para corroborar la integridad del DNA se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa (Invitrogen) al 0.8 % (p/v), cargando en el gel 2 µL del DNA genómico y 1 µL de solución de carga 6x (azul de bromofenol 0.25 %, azul de xilencianol 0.25 % y glicerol) en una cámara de electroforesis (Bio-Rad modelo: Mini-Sub® Cell GT) con solución de corrida TAE 1X (40mM Tris-HCl, 20mM ácido acético, 1mM

Tabla 2. Reactivos necesarios para realizar una PCR múltiple a un volumen final de 25 µL.

Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen a tomar
Buffer de Taq	10X	1X	2.5 µL
Taq	5 U/µL	1 U	0.2 µL
DNA	10 ng/µL	20 ng	2.0 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µL
Oligo T1-sentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µL
Oligo T1-antisentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µL
Oligo T12 o W11-sentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µL
Oligo T12 o W11-antisentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µL
H ₂ O			16.3 µL
Total			25.0 µL

EDTA pH 8.0) usando una fuente de poder (Bio-Rad modelo: POWER PAC™ HC) por 45 minutos a 80 volts, posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador (Vilber Lourmat modelo:Quantum-1000/26M) y fotodocumentado.

Amplificación

Se utilizaron las parejas de iniciadores (T1-T12) y (T1-W11) reportados por Deputy et al., (2002) para amplificar una secuencia específica ligado al sexo de la papaya; la mezcla de reacción se realizó en tubos para PCR a un volumen final de 25 μ L con el uso de un termociclador (Bio-Rad modelo PTC-100®), el programa consistió de una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C por 5 minutos y 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C desnaturalización, 30 segundos a 58°C para alineamiento y 90 segundos a 72 °C de extensión, finalmente una extensión de 7 minutos a 72 °C, las concentraciones finales de los reactivos se muestran en la tabla 2.

Electroforesis de los amplicones

Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) y fueron visualizados en un transiluminador, se verificó el tamaño de las bandas con marcadores moleculares.

Validación de resultados

Dos meses después de haber realizado las colectas y los análisis moleculares, se acudió nuevamente a la Boquilla para corroborar los resultados con los obtenidos por el productor en base a la morfología floral interna de las plantas seleccionadas.

Escrutinio floral

Para la determinación del tipo sexual de las flores colectadas, se visualizó la morfología interna, haciendo cortes longitudinales a las flores con una navaja de acero inoxidable (Gillette®). Las imágenes son mostradas en la figura 7 y fueron capturadas con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1000) equipado con una cámara CCD a color (Nikon, modelo: Digital Sight DS-FI2).

Resultados y discusión

El desempeño de los marcadores moleculares (T1, T12 y W11) reportados por Deputy et al., (2002) utilizados en el presente trabajo, para el “sexado” de plantas de papaya variedad maradol de la región Costa, fue satisfactorio debido a los patrones de amplificación de 1,300 pb y 800 pb visualizados en los diversos geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

De acuerdo al comportamiento inconsistente de los iniciadores T1 reportados por Aspeitia et al., (2014) en el “sexado” de la variedad maradol. Se procedió primeramente a verificar el desempeño individual de los iniciadores T1 reportados como control positivo, que amplifica para cualquier tipo sexual. Para ésto se realizaron dos PCR, la primera con la pareja de iniciadores (T1-F y T1-R) y la segunda con los iniciadores (W11-F y W11-R), mostrando la señal esperada de 1300 pb y 800 pb respectivamente como se muestra en la figura 4b que concuerdan con lo reportado por Deputy et al., (2002).

Una vez corroborado en comportamiento de los iniciadores T1 para ser usados como control positivo, se procedió a realizar las reacciones de PCR multiplex

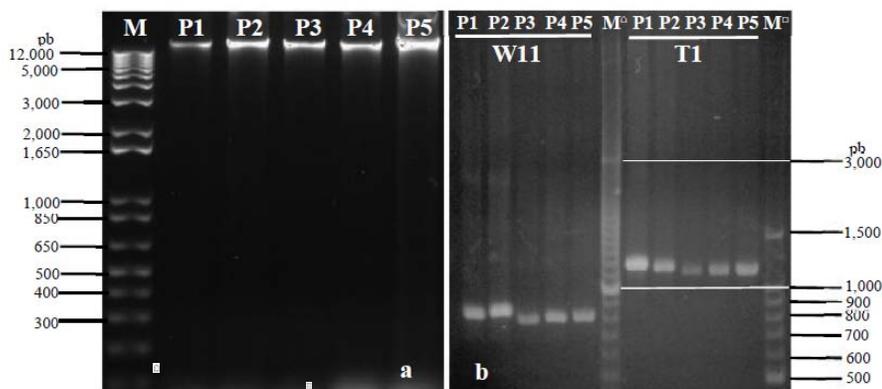


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa. a) (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus. Carriles P1 a P5 DNA genómico de tejido vegetal deshidratado, b) Productos de amplificación con la técnica de PCR simple, los primeros cinco carriles P1 a P5 presentaron una señal de amplificación de 800 pb aproximadamente con los iniciador W11, seguido por el marcador molecular (M) consiste de 30 fragmentos con un rango de 100 pb hasta 3000 pb. Por último el mismo DNA amplificado con los iniciadores T1 amplificaron una banda de 1300 pb seguido del marcador (M) que consiste de 11 líneas con un rango de 100 pb hasta 1000 pb con una línea adicional de 1500 pb.

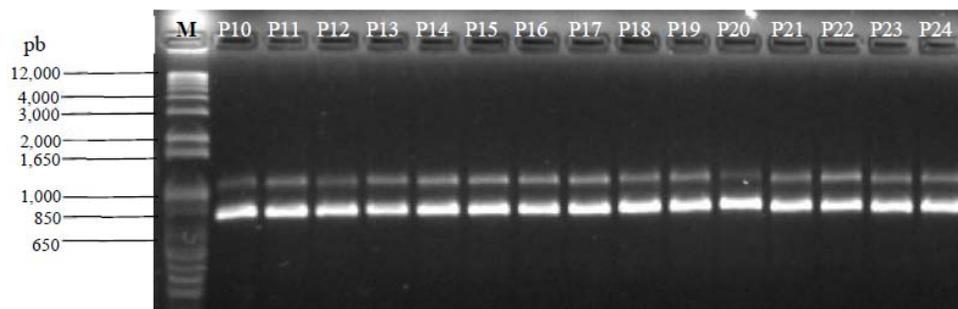


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa teñidos con GelRed® y visualizados con luz ultravioleta. Productos de amplificación realizando una PCR multiplex, carriles P10 a P24. Productos de PCR con los iniciadores T1 y T12, en todos los carriles se amplificó dos bandas de 1300 pb y 800 pb determinando de esta manera el tipo sexual hermafrodita de las plantas P10 a P24. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus.

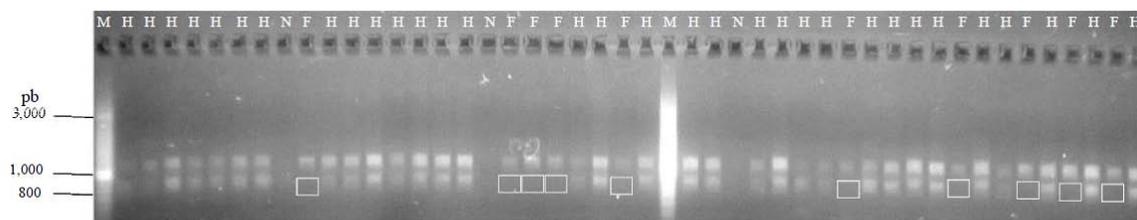


Figura 6. Productos de amplificación de una PCR multiplex, con los iniciadores T1 y W11, amplificó dos bandas de 1,300 pb y 800 pb determinando el tipo sexual hermafrodita (H), en algunos carriles hubo ausencia de la señal de 800 pb delimitada por un rectángulo. Sólo se amplificó la banda de 1,300 pb correspondiente a los iniciadores T1, cuyo resultado se interpretó como planta femenina (F) según lo reportado por Deputy et al., (2002). Para los carriles (N) no se cargó muestra. (M) marcador molecular de 30 fragmentos con un rango de 100 pb hasta 3000 pb.

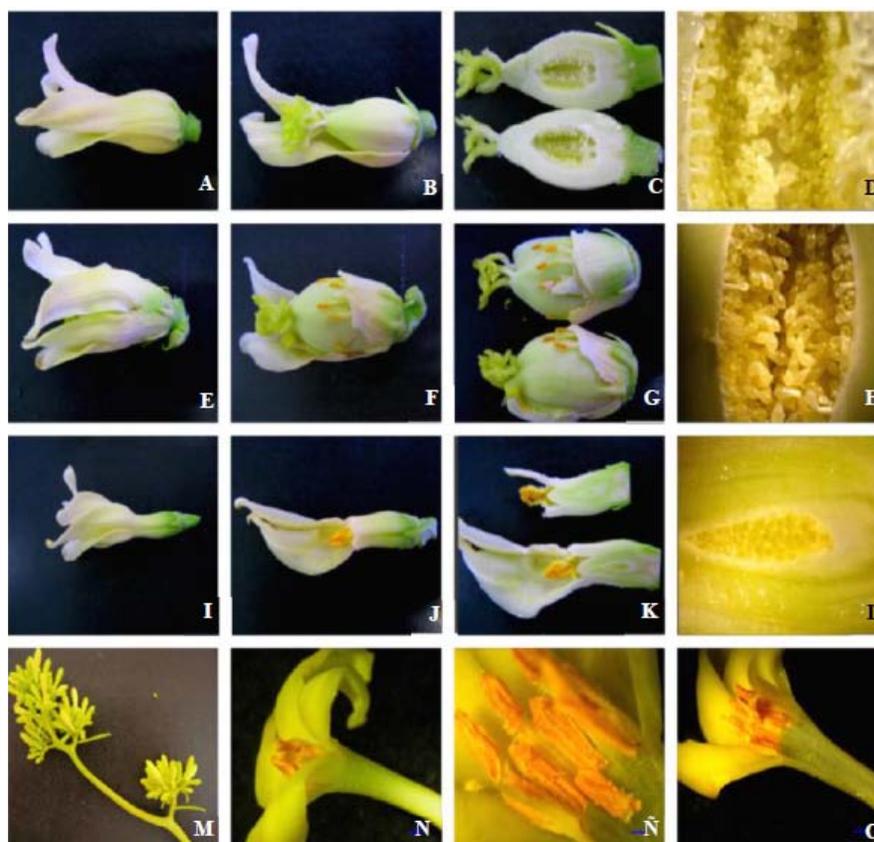


Figura 7. Morfologías florales. (A-D) Flor femenina, carente de estambres, este tipo de flores genera frutos de forma redonda o "bola", carente de valor comercial. (E-H) Flor hermafrodita, consiste en cinco pétalos, cinco pares de anteras y un ovario, los pétalos están fusionados en la parte baja de la flor, este tipo de flor produce frutos alargados, que son preferidos por el consumidor. (I-L) Flor hermafrodita que presenta cierto grado de esterilidad femenina, debido a la reducción de tamaño del pistilo (ovario, estilo y estigma). (M-O) Flor de tipo masculina, las flores están agrupadas en racimos, carentes de gineceo, presentando diez estambres

como fueron descritas por Deputy et al., (2002). En la figura 5 se muestra el desempeño de los marcadores (T1 y T12). Se dictaminó a nivel laboratorio que todas las plantas etiquetadas P10 a P24 son de tipo sexual hermafrodita.

Nuevamente se procedió a realizar la reacción de PCR multiplex pero utilizando el sistema de iniciadores (T1 y W11) propuesto por Deputy et al., (2002). En la figura 6 se muestra el producto de la amplificación en un gel de agarosa al 1.5% (p/v). El desempeño de los iniciadores concordó con lo reportado, donde se puede observar los carriles etiquetados como (H) que presentan dos señales de amplificación de 1,300 pb y 800 pb aproximadamente característicos del tipo sexual hermafrodita, los carriles marcados con (F) sólo mostraron una banda de 1,300 pb característico del control positivo y del tipo sexual hermafrodita.

Según datos proporcionados por el productor la relación de plantas femeninas y hermafroditas al momento del “sexado” en campo es de una relación (2:1), en contraste con las de tipo masculino. Se tiene reportado por Aspeitia et al., (2014) en la variedad maradol es muy poco frecuente encontrar plantas de tipo masculino. Se pudo constatar que en varios cultivares de la Boquilla este tipo sexual es muy poco probable encontrarlo.

Para determinar el porcentaje de confiabilidad de los marcadores moleculares reportados por Deputy et al., (2002) en las plantas de papaya maradol de la región Costa de Oaxaca. Los resultados de los análisis moleculares realizados en el laboratorio, fueron validados dos meses después en campo. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Se analizaron en total 228 plantas, de las cuales 150 fueron de 45 días de edad y el resto de 15 días, con los análisis moleculares de la primer colecta, se

determinaron 114 plantas de tipo hermafrodita y 36 plantas femeninas, del segundo muestreo resultaron 59 plantas hermafroditas y 19 femeninas, al haber llegado a la etapa de floración de las plantas analizadas se procedió a confirmar el porcentaje de equidad de los resultados obtenidos en laboratorio y en campo, mostrando una coincidencia del 100%.

Conclusiones

La identificación de plantas hermafroditas por la herramienta molecular descrita en el presente trabajo consta de cinco etapas definidas.

Los resultados ofrecidos por los marcadores moleculares reportador por Deputy et al., (2002) fueron exitosos al momento de realizar la comparación con el “sexado” tradicional en campo. Los marcadores moleculares tipo SCAR T1, T12 y W11 se comportan de manera confiable en la predicción temprana de plantas hermafroditas por lo que pueden ser usados para el “sexado” en los cultivos de papaya variedad maradol de la región Costa de Oaxaca.

La herramienta molecular propuesta en el presente trabajo presentó un costo de 45.76 pesos. Cabe destacar que las dos electroforesis involucradas en el proceso incrementan el costo de dicha herramienta, principalmente por el costo de la agarosa, ver anexo al final del documento.

El tiempo para “sexar” por persona cincuenta plantas es de cuatro días, distribuidos en la siguiente manera: dos días para la deshidratación del tejido foliar, el tercer día para la extracción de DNA y corroborar su integridad, cuarto día realización de la PCR- múltiple y visualización de los productos de amplificación en un gel de agarosa.

Tabla 3. Muestra la comparación de los resultados obtenidos del presente trabajo en laboratorio y campo. Utilizando los iniciadores descritos por Deputy et al., (2002).

Colecta	Plantas	Plantas (Hm)	Plantas (Hm) [‡]	Plantas (F)	Plantas (F) [‡]	% Predicción
1 ^{era}	150	114	114	36	36	100%
2 ^{da}	78	59	59	19	19	100%
Total	228	173	173	55	55	100%

Hm: Hermafrodita sexada con los marcadores moleculares; **F**: Femenina sexada con los marcadores moleculares.

Hm[‡]: Hermafrodita sexada por morfología floral; **F[‡]**: Femenina sexada por morfología floral.

La etapa de secado se puede omitir disminuyendo drásticamente el tiempo de procesamiento con el uso de nitrógeno líquido, pero el costo incrementaría. La región Costa al ser la principal región productora del estado de Oaxaca, donde se cultivan 2,283 hectáreas (SIAP, 2015). Se traduce como un blanco potencial para que esta herramienta sea aplicada. Por lo que es necesario diseñar metodologías más eficientes, que permitan ofrecer al sector agrícola la actividad del “sexado” a una escala industrial, en un menor tiempo y a un precio accesible. Para que sea de interés a los productores de papaya maradol de la región Costa de Oaxaca.

Como alternativas para procesar grandes cantidades de plantas en un tiempo más corto, se propone diseñar protocolos de extracción de DNA más simples y económicos, el perfeccionamiento de la técnica de diseño de iniciadores tipo LAMP y la adopción de tecnologías de procesamiento de imágenes para la búsqueda de indicadores morfométricos foliares.

Anexo Agradecimientos

A la Dra. Irma Gisela Nieto Castañeda por las facilidades otorgadas en la captura de las imágenes florales, al Ing. Alberto Reyes Cisneros por proporcionar el tejido vegetal y al productor Marco

Tabla 4. Desglose de las cantidades y costos de los reactivos y materiales, para realizar la técnica del sexado a nivel molecular.

COSTO DE LA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PLÁNTULA DE PAPAYA var. maradol									
SECADO DE TEJIDO VEGETAL	MARCA	PRESENTACIÓN	CANTIDAD EN EL ENVASE	UNIDADES DEL ENVASE	PRECIO DEL PRODUCTO	PRECIO DEL PRODUCTO + IVA	CANTIDAD REQUERIDA	UNIDADES DE LA CANTIDAD REQUERIDA	PRECIO POR LA CANTIDAD REQUERIDA
Silica gel	CAMEN	PERLAS	1000	GRAMO	339.25	393.53	20	GRAMOS	0.78706
Bolsa ziplock	FAB NAC	PAQUETE	100	PIEZAS	61	70.76	1	PIEZA	0.7076
Papel cera	SCIENTIFIC	BLOCK	100	HOJAS	105	121.8	1	HOJA	1.218
EXTRACCIÓN DNA									
REACTIVOS									
CTAB	SIGMA	POLVO	100	GRAMOS	2057	2386.12	0.012	GRAMOS	0.2863344
NaCl	MEYER	POLVO	500	GRAMOS	71	82.36	0.15	GRAMOS	0.024708
EDTA	MEYER	POLVO	500	GRAMOS	446	517.36	0.087	GRAMOS	0.09002064
Tris	SIGMA	POLVO	1000	GRAMOS	2034	2359.44	0.094	GRAMOS	0.22178736
RNAasa	SIGMA	POLVO	10	MILIGRAMOS	679	787.64	0.05	MILIGRAMOS	3.9382
Cloroformo	MEYER	LIQUIDO	500	MILILITROS	226	262.16	0.49	MILILITROS	0.2569168
Octanol	SIGMA	LIQUIDO	1000	MILILITROS	1710	1983.6	0.01	MILILITROS	0.019836
Acetato de amonio	MEYER	POLVO	500	GRAMOS	199.75	231.71	0.114	GRAMOS	0.05282988
Etanol Absoluto	MEYER	LIQUIDO	4000	MILILITROS	634	735.44	0.6	MILILITROS	0.110316
Agua	PISA	LIQUIDO	500	MILILITROS	21.86	25.3576	0.05	MILILITROS	0.00253576
CONSUMIBLES									
Puntas 1000µL	AXIGEN	CAJA	1000	PUNTAS	273.3	317.028	5	PIEZA	1.58514
Puntas 200µL	AXIGEN	CAJA	1000	PUNTAS	248.9	288.724	3	PIEZA	0.866172
Tubos eppendorf	AXIGEN	CAJA	500	PUNTAS	192.5	223.3	2	PIEZA	0.8932
Gautes	SUPRENO	CAJA	100	PIEZAS	245	284.2	2	PIEZA	5.684
ELECTROFORESIS DE DNA									
Agua destilada	PISA	LIQUIDO	500	MILITROS	21.86	25.3576	58	MILILITROS	2.9414816
Agarosa ultrapura	IBI	POLVO	500	GRAMOS	3450	4002	0.4	GRAMOS	3.2016
Tris base	SIGMA	POLVO	1000	GRAMOS	2034	2359.44	0.161333333	GRAMOS	0.38065632
EDTA	MEYER	POLVO	500	GRAMOS	446	517.36	0.0248	GRAMOS	0.025661056
Ácido acético glacial	J. T. BAKER	LIQUIDO	500	MILILITROS	321.5	372.94	0.038066667	MILILITROS	0.028393165
1 Kb DNA Plus	BIO LINE	LIQUIDO	1000	MICROLITROS	2169.78	2516.9448	1	MICROLITRO	2.5169448
Gel Red	BIOTIUM	LIQUIDO	500	MICROLITROS	3887	4508.92	0.001	MICROLITROS	0.00901784
Buffer de carga	INVITROGENE	LIQUIDO	3000	MICROLITROS	4523	5246.68	1	MICROLITROS	1.748893333
Puntas 10µL	AXIGEN	CAJA	1000	PUNTAS	253.8	294.408	1	PUNTA	0.294408
PCR									
Iniciador T1F	T4 OLIGO	LIOFILIZADO	100	MICROMOLAR	143	165.88	0.2	MICROMOLAR	0.33176
Iniciador T1R	T4 OLIGO	LIOFILIZADO	100	MICROMOLAR	143	165.88	0.2	MICROMOLAR	0.33176
Iniciador T12F	T4 OLIGO	LIOFILIZADO	100	MICROMOLAR	150.15	174.174	0.2	MICROMOLAR	0.348348
Iniciador T12R	T4 OLIGO	LIOFILIZADO	100	MICROMOLAR	150.15	174.174	0.2	MICROMOLAR	0.348348
Tag Buffer y MgCl ₂	BIOTECHMOL	LIQUIDO	500	UNIDADES	1300	1508	0.2	UNIDADES	0.6032
dNTPmix 10mM	SIGMA	LIQUIDO	500	MICROLITROS	1773.6	2057.376	0.5	MICROLITROS	2.057376
Agua inyectable	PISA	LIQUIDO	500000	MICROLITROS	21.86	25.3576	10.8	MICROLITROS	0.000547724
Puntas 10µL	AXIGEN	CAJA	1000	PUNTAS	253.8	294.408	7	PUNTAS	2.060856
ELECTROFORESIS DE PCR									
Agua destilada	PISA	LIQUIDO	500	MILITROS	21.86	25.3576	58	MILILITROS	2.9414816
Agarosa ultrapura	IBI	POLVO	500	GRAMOS	3450	4002	0.48	GRAMOS	3.84192
Tris base	SIGMA	POLVO	1000	GRAMOS	2034	2359.44	0.161333333	GRAMOS	0.38065632
EDTA	MEYER	POLVO	500	GRAMOS	446	517.36	0.0248	GRAMOS	0.025661056
Ácido acético glacial	J. T. BAKER	LIQUIDO	500	MILILITROS	321.5	372.94	0.038066667	MILILITROS	0.028393165
1 Kb DNA Plus	BIO LINE	LIQUIDO	1000	MICROLITROS	2169.78	2516.9448	1	MICROLITRO	2.5169448
Gel Red	BIOTIUM	LIQUIDO	500	MICROLITROS	3887	4508.92	0.001	MICROLITRO	0.00901784
Buffer de carga	INVITROGENE	LIQUIDO	3000	MICROLITROS	4523	5246.68	1	MICROLITRO	1.748893333
Puntas 10µL	AXIGENE	CAJA	1000	PUNTAS	253.8	294.408	1	PUNTA	0.294408
TOTAL									45.761285

Santo Sánchez por su experiencia en el “sexado” en campo. A la Universidad del Mar por el apoyo económico otorgado para realizar la presente investigación, a los laboratorios de Biología Molecular y Marcadores Moleculares del INIFAP-Bajío por sus aportaciones.

Bibliografía

- Aspeitia, V., Torres, M., Mendoza, D., Reyes, H. (2014). Evaluación de marcadores genéticos para discriminación entre hembras y hermafroditas de papaya (*Carica papaya* L.) variedad maradol. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 37(3).193-197.
- Chavez, G., Nuñez, V. (2007). A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica*. Vol. 153. 215-220.
- Chaturvedi, K., Bommisetty, P., Pattanaik, A., Chinnaiyan, V., Ramachandra, D., Chennareddy, A. (2014). PCR detection assay for Sex determination in papaya Using SCAR Marker. *Acta Botanica Croatica*. Vol. 73(2). 291-298.
- Deputy, J., Ming, R., Ma, H., Liu, Z., Fitch, M., Wang, M., Manshardt, R., Stiles, J. (2002). Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica Papaya* L.). TAG. *Theoretical and applied genetics*. Vol. 106. 107-111.
- Devitt, C., Sawbridge, T., Holton, T., Mitchelson, K., Dietzgen, R. (2006). Discovery of Genes Associated with Fruit Ripening in *Carica papaya* using Expressed Sequence Tags. *Plant Science*. Vol. 170(2). 356-63.
- FAOSTAT (2014). *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division*. [en línea] Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> [Revisado el 6 de septiembre del 2016].
- Gschwend, A., Yu, Q., Moore, P., Saski, C., Chen, C., Wang, J., Na, J., Ming, R. (2011). Construction of papaya male and female BAC libraries and application in physical mapping of the sex chromosomes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol.2011. 1-7.
- Hsu, T., Gwo, J., Lin, K. (2012). Rapid sex identification of papaya (*Carica papaya*) using multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP). *Planta*. Vol. 236. 1239-1246.
- Jimenez, J.A. (2002). Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana. Costa Rica: EARTH.
- Lemos, E., Soares, C., Zaidan, H. (2002). Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica*. Vol. 127. 179-184.
- Liu, Z., Moore, P., Ma, H., Ackerman, C., Raglba, M., Yu, Q., Pearl, H., Kim, M., Charlton, J., Stiles, J., Zee, F., Paterson, A., Ming, R. (2004). A Primitive Y Chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*. Vol. 427(6972).348-352.
- Ming, R., Yu, Q., Moore, P. (2007). Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Vol. 18. 401-408.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe K., Amino, N., Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. Vol. 28(12). 1-7.
- Porebski, L., Grant, B., Bernard, B. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 15 (1). 8-15.
- Primer Explorer (2016). Programa para el diseño de iniciadores tipo LAMP. Versión 4.0. Fujitsu, Tokio, Japón. [en línea] Disponible en: <https://primerexplorer.jp/e/> [Revisado el 6 de septiembre del 2016].
- Reddy, S., Krishna, R., Reddy, J. (2012). Sex determination of papaya (*Carica papaya*) at Seedling Stage through RAPD Markers. *Research in Biotechnology*. Vol. 3(1). 21-28.
- Saalau, Ericka., Santamaría, W., Loría, C., Brenes, A., Gómez, L. (2009). Identificación mediante pcr del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido "Pococi". *Agronomía Mesoamericana*. Vol. 20(2). 311-317.
- Sánchez, Erika., Nuñez, V. (2008). “Evaluación de Marcadores Moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). *Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol. 9(2). 31-36.
- SIAP (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [en línea] Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx> [Revisado el 19 septiembre de 2016].

Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I., Terauchi, R. (2002). A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 1(104). 281-285.

Urasaki, N., Tarora, K., Shudo, A., H. Ueno, H., Tamaki, M., Miyagi, N., Adaniya, S., Matsumura H. (2012). Digital Transcriptome Analysis of Putative Sex-Determination Genes in Papaya (*Carica papaya*). *PLoS One*. Vol. 7(7). 1-9.

Zeng F., Yu, Q., Hou, S., Moore, P., Alam, M., Ming, R. (2014). Features of transcriptome in trioecious papaya revealed by a large-scale sequencing of ESTs and comparative analysis in higher plants. *Plant Omics Journal*. Vol. 7(6). 450-460.