

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Erika Sánchez-Betancourt¹,
 Víctor Manuel Núñez Zarrantes²

**Evaluation of SCAR molecular markers
 to determine sex in papaya plants
 (*Carica papaya* L.)**

ABSTRACT

In this study the molecular markers SCAR-SDSP, SCAR T1 and W11 -reported as sex discriminators at seedling level-, were used to validate the effectiveness in flowered plants in the field. SCAR-SDSP amplified a band of 369 bp in male and hermaphrodite plants which allows corroborate the results obtained with this marker, developed at Corpoica using Colombian genotypes, in a previous study. With the use of the SCAR T1 and W11 markers combined in one reaction, it was possible to differentiate female and hermaphrodite plants. When the sex prediction was done with a blind sample using two months-old plantlets, from commercial seeds, a ratio of 1:1 female:hermaphrodite was observed, according to the segregation pattern of a cross between these two types of plants. The amplification with the SCAR W11 generated a band of 800 bp in male and hermaphrodite plants, independently of the sample's place of origin. However, when this band was sequenced and analyzed with the BLAST program, the analysis showed 98% identity between male and hermaphrodite sequence.

Keywords: Plant sexual organs, DNA sequence, seedlings, sex determination, economic importance.

Radicado: 7 de octubre de 2008
 Aceptado: 9 de diciembre de 2008

¹ Investigadora profesional, Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, C.I. Tibaitatá, Mosquera. esbetancourt@corpoica.org.co

² Investigador principal, Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, C.I. Tibaitatá, Mosquera. vnunez@corpoica.org.co

Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.)

RESUMEN

En este estudio se emplearon los marcadores moleculares SCAR-SDSP, SCAR T1 y W11, registrados como secuencias específicas, para discriminar el sexo en las plántulas de papaya y validar su efectividad en plantas florecidas en campo. El SCAR-SDSP amplificó una banda de 369 pares de bases en plantas machos y hermafroditas, lo que permitió corroborar los resultados obtenidos con este marcador, desarrollado en Corpoica en un estudio anterior que utilizó genotipos colombianos. Con el uso de los marcadores SCAR T1 y W11 combinados en una sola reacción, se diferenció el sexo de plantas hembras y hermafroditas. En la predicción de sexos, en una muestra ciega utilizando plántulas de dos meses de edad derivadas de semilla comercial, se observó una proporción de 1:1 de hembras:hermafroditas, lo esperado según el patrón de segregación en un cruce entre estos dos tipos de plantas. La amplificación con el marcador SCAR W11 generó una banda de 800 pares de bases en plantas machos y hermafroditas, independientemente del lugar de procedencia de la muestra. Sin embargo, cuando esta banda se secuenció y analizó con el programa BLAST mostró identidad de 98% entre las secuencias de machos y hermafroditas.

Palabras clave: órganos sexuales de las plantas, secuencia de ADN, plántula, determinación de sexo, importancia económica.

INTRODUCCIÓN

LA PAPAYA (*Carica papaya* L.) es la especie del género *Carica* económicamente más importante de la familia Caricaceae. Esta planta es nativa de Centroamérica y de la costa occidental suramericana, principalmente de los valles húmedos de la cordillera andina. Crece en condiciones cálidas con abundante lluvia o irrigación, en un rango de altitud desde el nivel del mar hasta 1600 m. Los frutos de la papaya tienen gran aceptación en los mercados nacionales e internacionales (Reyes, 2003).

Esta fruta es una especie polígama que presenta tres tipos sexuales: plantas estaminadas o masculinas, pistiladas o femeninas y bisexuales o hermafroditas (Malo y Campbell, 1994). Genéticamente, la expresión del sexo es controlada por un solo gen con tres alelos, los cuales exhiben efecto pleiotrópico. El genotipo sexual fue designado como M para plantas masculinas, M^H para hermafroditas y m para femeninas. Todas las combinaciones de alelos dominantes, tales como MM, M^HM^H y M^HM son letales, por lo tanto, los machos y hermafroditas son heterocigotos obligados. En consecuencia, los genotipos viables son Mm para plantas masculinas, M^Hm para hermafroditas y mm para femeninas (Storey, 1953).

Debido al estado polígamo de la papaya, el conocimiento del sexo de la misma es una herramienta para apoyar al agricultor, no sólo para la obtención de la semilla, sino también para el manejo del cultivo. En casos en que es necesario el uso de plantas macho, deben distribuirse, en relación con las hembras, adecuadamente para asegurar la polinización. Hasta ahora, la determinación del sexo no es posible antes de que la planta alcance el estado de floración, que ocurre cinco a ocho meses después de la siembra de la semilla, ya que no existen diferencias embriológicas ni morfológicas entre los tres tipos sexuales en etapas tempranas antes de la prefloración (Rojas, Ramos y Salazar, 1985). Por lo tanto, la diferenciación sexual se ha convertido en una limitante para el cultivador de papaya puesto que implica costos adicionales y dificultades en la planeación del cultivo, especialmente en plantaciones donde se requiere solamente plantas hermafroditas.

La semilla utilizada para plantaciones comerciales segrega en una proporción de 1:1 hembras y hermafroditas. Las plantas hembras producen frutas redondas, mientras que las hermafroditas producen frutas alargadas. Estas frutas alargadas son preferidas por los comercializadores debido a la mayor facilidad para el

empaquete. Es deseable y muy importante seleccionar plantas de sexo hermafrodita para obtener plantaciones de frutas alargadas en mayor proporción. Por lo tanto, la determinación del sexo de las plántulas antes de llevarlas a campo definitivo sería una ganancia considerable en tiempo, espacio y dinero para el productor. Una vez conocido el sexo, el agricultor determina con qué plantas obtendrá mayores rendimientos y podrá sembrarlas de acuerdo con las exigencias del mercado (Acosta y León, 2003).

Por otro lado, la naturaleza dioica, la reversión ocasional del sexo de las flores masculinas y hermafroditas junto con la ausencia de un par heteromórfico de cromosomas sexuales hacen de las plantas de papaya un sistema interesante para estudiar la diferenciación sexual desde el punto de vista molecular (Magdalita y Mercado, 2003; Sánchez y Medina, 2003). Estas técnicas permiten una identificación rápida y confiable, son cómodas y algunas no requieren del conocimiento previo sobre la secuencia que se amplifica. Para diferenciar el sexo en papaya se han desarrollado marcadores moleculares tipo secuencias caracterizadas de regiones amplificadas (sequence characterized amplified region –SCAR-) (Deputy *et al.*, 2002; Urasaki *et al.*, 2002; Magdalita y Mercado, 2003; Chaves y Núñez, 2007). En Colombia, Chaves y Núñez (2007) desarrollaron el marcador SCAR-SDSP y en la Universidad de Hawai se desarrollaron los marcadores SCAR T1 y W11. Con el SCAR-SDSP se amplifica un fragmento de 369 pares de bases (pb) en plantas machos y hermafroditas, lo que permite diferenciar estos dos tipos sexuales de las hembras. Con los marcadores SCAR T1 y W11, Magdalita y Mercado (2003) diferenciaron los tres tipos sexuales en papaya, al amplificar dos bandas -una de 1300 pb y otra de 800 pb- en plantas hermafroditas; una banda de 1300 pb en plantas hembras; y en machos, ausencia de banda.

Comercialmente se busca la diferenciación de sexo entre plantas hembras y hermafroditas, por lo tanto, la presente investigación se hizo con el fin de evaluar marcadores moleculares tipo SCAR para determinar el sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.), para establecer una metodología rápida que permita brindar

asesoría a los productores mediante el sexaje de plántulas de vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular Vegetal del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica-Tibatata), ubicada en el municipio de Mosquera, Cundinamarca.

Material biológico

En total se usaron 52 muestras de papaya (*Carica papaya* L.), de las cuales 24 fueron plantas florecidas (tabla 1) y 28 plántulas sin florecer. Además, se incluyeron ocho accesiones correspondientes a tres especies de papayuela (*Vasconcella* spp.) para validar la especificidad de los marcadores SCAR empleados en este estudio con relación a la especie *Carica papaya*, puesto que el género *Vasconcella* pertenece a la

Tabla 1. Material vegetal usado en el estudio

Especie	No. accesión	No. individuo	Sexo*	Procedencia	Genotipo
<i>C. papaya</i>	299		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	639		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	646		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	651		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	655		He	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	678		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	691		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	707		He	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	708		He	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>	716		H	C.I. La Libertad	ILS
<i>C. papaya</i>		P1	He	Armenia	Comercial
<i>C. papaya</i>		P2	M	Armenia	Comercial
<i>C. papaya</i>		P3	H	Armenia	Comercial
<i>C. papaya</i>		1NAT	M	El Espinal	Comercial
<i>C. papaya</i>		2NAT	He	El Espinal	Comercial
<i>C. papaya</i>		3NAT	H	El Espinal	Comercial
<i>C. papaya</i>		4NAT	H	El Espinal	Comercial
<i>C. papaya</i>		5NAT	M	El Espinal	Comercial
<i>C. papaya</i>		6NAT	He	El Espinal	Comercial
<i>C. papaya</i>		1SM	M	C.I. Caribia	Zapote
<i>C. papaya</i>		2SM	H	C.I. Caribia	Zapote
<i>C. papaya</i>		3SM	He	C.I. Caribia	Zapote
<i>C. papaya</i>		4SM	H	C.I. Caribia	Zapote
<i>C. papaya</i>		5SM	He	C.I. Caribia	Zapote
Papayuela					
<i>V. goudotiana</i>	501005		H	C.I. La Selva	
<i>V. goudotiana</i>	501005		M	C.I. La Selva	
<i>V. cauliflora</i>	501033		H	C.I. La Selva	
<i>V. cauliflora</i>	501036		H	C.I. La Selva	
<i>V. pubescens</i>	501038		M	C.I. La Selva	
<i>V. pubescens</i>	501038		H	C.I. La Selva	
<i>V. cauliflora</i>	501045		M	C.I. La Selva	
<i>V. goudotiana</i>	501047		H	C.I. La Selva	

*Se emplea H para designar a hembras, He para hermafroditas y M para machos.

familia Caricaceae de la cual hace parte el género *Carica*.

Extracción de ADN

El ADN total se aisló a partir de hojas jóvenes de plantas machos, hembras y hermafroditas, siguiendo el protocolo descrito por Rocha (2002). La calidad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio a 0,1 µg/mL usando el software Gene-snap. La concentración del ADN se determinó por cuantificación a partir de marcador de masa (High DNA Mass Ladder (Invitrogen), usando el software Gene-tool. Este programa compara el patrón de bandas generado y la banda obtenida por cada muestra y da un estimativo de la concentración obtenida a 260 nm. Igualmente, se utilizó el espectrofotómetro UV 260/280 (Beckman Du530) para corroborar la concentración y determinar la pureza de la muestra.

Amplificación de ADN

Tanto las muestras de papaya como las de papayuela se amplificaron con el marcador SCAR-SDSP (Fw 5'-AAACTACCGT-GCCATTATCA-3' y Rv 5'-TCTCTACCCA-ACACAGTGAC-3') reportado por Chaves y Núñez (2007) y los marcadores SCAR T1 (Fw 5'-TGCTCTTGATATGCTCTCTG-3' y Rv 5'-TACCTTCGCTCACCTCTGCA-3') y W11 (Fw 5'-CTGATGCGTGTGTGGCTC-TA-3' y Rv 5'-CTGATGCGTGATCATC-TACT-3') reportados por Magdalita y Mercado (2003). Con los marcadores SCAR T1 y W11 se realizó una PCR múltiplex y una PCR usando cada marcador por separado. Las condiciones de amplificación se optimizaron para un volumen final de 20 µL de acuerdo con lo reportado por Chaves y Núñez (2007) para el SCAR-SDSP y Magdalita y Mercado (2003) para el SCAR T1 y W11. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0,1 µg/mL). El peso de las bandas se determinó utilizando como patrón el marcador 100 pb (Promega).

Limpieza y secuenciación de las bandas generadas con los marcadores SCAR T1 Y W11

En plantas machos y hermafroditas se observó el mismo producto de amplifica-

ción; en consecuencia, con el propósito de dilucidar si estas bandas correspondían a secuencias diferentes, se escogieron aleatoriamente, por lugar de procedencia, dos individuos machos y cuatro hermafroditas de los genotipos zapote, ILS y papaya comercial, para determinar la secuencia de la banda de 800 pb. Estos productos amplificados se secuenciaron automáticamente con el software de secuenciación ABI Big Dye TM Terminator de Macrogen (Corea), utilizando los cebadores T1 y W11. La limpieza y purificación de las bandas se hizo con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system®. Las secuencias se analizaron usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y se realizó un alineamiento múltiple usando ClustalW. Luego se hizo una comparación para determinar homología con las secuencias existentes en el GeneBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares en la discriminación sexual, se usaron en total 52 muestras vegetales provenientes de cultivos comerciales. El número de muestras por cada lugar fue variable, de acuerdo con el material disponible en campo en el momento de la recolección. Al igual que en este estudio, otras investigaciones en las que se empleó este tipo de marcadores, utilizaron un tamaño variable de muestra. Por ejemplo, Mandolino y colaboradores (1999) trabajaron con 167 plantas que corresponden a siete cultivares; Urasaki y colaboradores (2002) usaron 11 cultivares, con un total de 45 individuos; Deputy y colaboradores (2002) usaron en conjunto ADN de 25 individuos por sexo; Magdalita y Mercado (2003) utilizaron 95 individuos en tres cultivares; Xu, Wang y Cui (2004) manejaron 10 individuos por cada sexo, y Chaves y Núñez (2007) utilizaron, de tres cultivares, en total siete individuos.

Con los marcadores SCAR evaluados no se obtuvo amplificación de ADN en las especies de papayuela. Teniendo en cuenta que las papayuelas pertenecen a un género diferente (*Vasconcella*), este resultado se podría explicar por la falta de especificidad de los cebadores en esta especie. Lo cual quiere decir que los SCAR utilizados en este estudio son altamente específicos para la especie papaya, puesto que, además de contener 20 nucleótidos, fueron diseñados a partir de secuencias amplificadas en papaya. Por ende, y de acuerdo con Paran y Milcheltmore (1993), es muy baja la posibilidad que estos marcadores amplificaran una secuencia homóloga en algún ADN diferente al de papaya.

Al amplificar con el marcador SCAR-SDSP, en las muestras de papaya se observaron bandas de aproximadamente 369 pb en machos y hermafroditas y ausencia de bandas en hembras, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Chaves y Núñez (2007). En ese estudio, el SCAR-SDSP genera una banda común para machos y hermafroditas (figura 1). Debido a que este marcador fue desarrollado a partir de genotipos colombianos y el material de este estudio tiene la misma procedencia, se esperaban estos resultados, lo cual confirma la validez del SCAR desarrollado por Chaves y Núñez (2007).

Con los marcadores SCAR T1 y W11 se observaron resultados diferentes, dependiendo de si se usaban separados o en combinación. En plantas machos y hermafroditas, con el SCAR T1 se amplificó una banda de 1300 pb, mientras que con el SCAR W11, una banda de 800 pb. Con los cebadores T1 y W11 combinados (PCR múltiplex) también se observaron las mismas bandas en plantas machos y hermafroditas. En las plantas hembras, machos y hermafroditas, T1 amplificó un producto de 1300 pb, mientras W11 no amplificó ningún producto en las hembras, y la



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observan las bandas amplificadas en machos y hermafroditas con el marcador SCAR-SDSP. El número sobre cada banda corresponde a la accesión o al individuo y el respectivo sexo (H para hembras, He para hermafroditas y M para machos)

combinación de los dos cebadores (múltiple) amplificó sólo una banda de 1300 pb en hembras (figura 2). De acuerdo con estos resultados, al realizar la PCR múltiple, se pueden discriminar las plántulas hembras de las plántulas machos y hermafroditas (figura 2). Teniendo en cuenta que sólo se comercializan plantas hermafroditas y hembras, el uso de este marcador es muy útil, pues permite diferenciar claramente estos dos tipos sexuales. Con el SCAR-SDSP sólo se pueden identificar, por presencia de bandas, las plantas hermafroditas puesto que hay ausencia de bandas en las hembras. Para el caso de programas de mejoramiento genético, sería deseable diferenciar plantas hermafroditas de machos, especialmente si se encuentran plantas machos tolerantes a factores bióticos o abióticos, y se quisiera introducir esta característica en plantas hermafroditas comerciales.

Los resultados antes mencionados no concuerdan con los obtenidos por Magdalita y Mercado (2003). En ese estudio se logró la diferenciación sexual al obtener dos bandas en las plantas hermafroditas, una banda para hembras y ausencia de bandas en machos. La diferencia en los resultados utilizando los mismos marcadores se podría explicar por la variabilidad genética molecular de los genotipos de papaya. Esta variabilidad se ha determinado en poblaciones de papaya analizadas con marcadores AFLP (Kim *et al.*, 2002) y es aún más evidente, como en este caso, cuando se trata de genotipos de diferentes continentes. Magdalita y Mercado (2003) utilizaron la variedad hawaiana, la cual no responde de la misma manera que otras variedades de papaya, cuando se emplean marcadores SCAR (Deputy *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Chaves y Núñez, 2007). Kim y colaboradores (2002) atribuyen este comportamiento a la gran diversidad genética de estas plantas producto

de los cruces ocasionales que se presentan en el campo. Las diferencias en los resultados de la amplificación de genotipos de diferentes procedencia han sido observadas en trabajos previos (Chaves-Bedoya y Núñez, 2007, Oliveira *et al.*, 2008).

Ya que el marcador SCAR T1 amplifica un producto en todas las plantas de papaya, independientemente del sexo, este resultado sería útil como un control positivo de amplificación para analizar diferentes genotipos dentro de la especie y evaluar la calidad de ADN de individuos de un mismo genotipo. En el presente estudio este marcador se utilizó para predecir el sexo e identificar las plántulas hermafroditas. De las 28 muestras correspondientes a la muestra ciega -plantas comerciales de 2 meses de edad- analizada con los marcadores SCAR T1 y W11, se identificaron 12 plantas hembras y 16 hermafroditas. En plantaciones comerciales, la presencia de plantas hembras y hermafroditas tiene una proporción de 1:1, de acuerdo con el patrón de segregación esperado, lo cual concuerda con los resultados mencionados.

Deputy y colaboradores (2002) construyeron un mapa genético empleando marcadores SCAR donde incluyen el marcador W11. En este mapa el marcador W11 ha sido ubicado en el cromosoma Y, ligado al locus Sex1 a una distancia de 0,3 cM. Según Liu y colaboradores (2004), las plantas machos y hermafroditas llevan un cromosoma Y donde se ubica el locus de determinación sexual Sex1. Esto explicaría el resultado de amplificación obtenido con este marcador en los dos tipos sexuales.

Análisis de secuencias

Debido a que no fue posible diferenciar plantas machos y hermafroditas, por el

tamaño de las bandas con los marcadores utilizados, se decidió hacer un análisis comparativo de la secuencia de la banda presente en estos dos tipos sexuales amplificada con el marcador SCAR W11. Al realizar el alineamiento por ClustalW con las secuencias obtenidas a partir de este marcador se encontró una identidad de 98% entre las secuencias de plantas hermafroditas y plantas machos, procedentes de diferentes lugares. El 2% restante de las secuencias corresponde a polimorfismos de una base, los cuales fueron corroboradas con el cromatograma para descartar la posibilidad de polimorfismos erróneos al ser transferidos al formato Fasta. Asimismo, el BLASTn confirmó que el producto secuenciado pertenece a la especie *Carica papaya* L., derivada de la amplificación del ADN genómico. Esta secuencia posiblemente se ubica en el cromosoma Y; además, es una secuencia específica para machos y hermafroditas. En la base de datos del GeneBank se han registrado seis secuencias con variaciones de un nucleótido, accesiones FJ011100, FJ011101, FJ011102, FJ011103, FJ011104 y FJ011105. Estas secuencias presentaron un valor e de 0 con trabajos previos en *Carica papaya* realizados por Ko y colaboradores (sin publicar) accesión AY849325, Liu y colaboradores (2004) accesión AY428939 y Yu y colaboradores (2007) accesión EF661024. No se encontró una secuencia con un valor e inferior a $1e^{-10}$ con proteínas reportadas en plantas.

En papaya se describió un cromosoma Y de tipo homomórfico sobre el cual se ubica el marcador W11 (Deputy *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). Debido a la gran similitud encontrada entre la secuencia de machos y hermafroditas como producto de la amplificación con este marcador, y a su ubicación sobre el cromosoma Y, además de la regulación del desarrollo floral, se podría pensar que el sistema de determinación del sexo estaría influenciado por factores de transcripción.

Un factor de transcripción es una proteína que después de ser estimulada por señales citoplasmáticas, tiene la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular que actúa reconociendo sitios en el ADN, a otro factor o a la ARN polimerasa (Celada, 1991). Al respecto, Sondur, Manshardt y Stiles (1996) sugi-

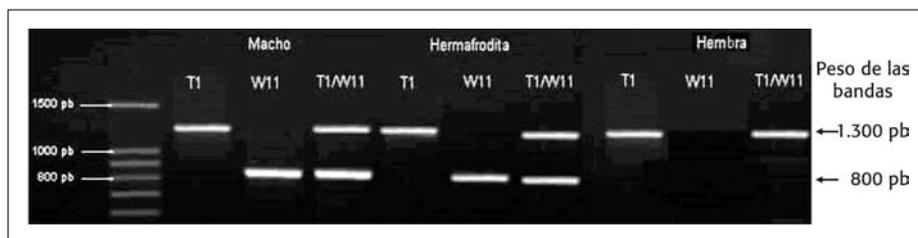


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Visualización de las bandas correspondientes a las plantas machos, hermafroditas y hembras amplificadas con los marcadores T1, W11 y en combinación de los dos cebadores (T1/W11)

rieron un modelo de tipo sexual basado en alelos alternos de un gen que codifican este tipo de factores. Proponen que el alelo masculino del gen sexual, designado Sex1-M, codifica un factor de transcripción que induce el desarrollo de partes florales masculinas a la vez que inhibe el desarrollo de los carpelos. El alelo hermafrodita Sex1-H es intermedio, pues induce las estructuras masculinas -pero sólo reduce el tamaño del carpelo- mientras los carpelos funcionales estarían en las plantas Sex1-H/sex1-f. El alelo Sex1-f sería incapaz de inducir estructuras masculinas y podría ser un alelo nulo.

Se explica que los sexos de papaya, además de diferir en la funcionalidad del androceo y el gineceo, tienen varias características sexuales secundarias que cosegregan de manera diferente. Entre ellas están la forma, el grado de la fusión de la corola, el número de flor y longitud de pedúnculo. Esto permite formular la hipótesis de que el sexo en la papaya es controlado por múltiples genes ligados estrechamente; es decir, las formas alélicas que constituyen los segmentos diferenciales del cromosoma. Incluido en esta hipótesis está un supresor de recombinación asociado con esta región cromosómica que mantiene todos estos genes ligados como una simple unidad hereditaria (Sondur *et al.*, 1996).

Por lo anterior, se puede deducir que los marcadores empleados en el presente estudio no amplifican los diferentes alelos involucrados en la determinación sexual. En consecuencia se podría pensar que ésta sería una razón para que no se lograra discriminar entre el tipo sexual macho y hermafrodita. Es posible que existan otros factores que intervienen en la formación del conjunto de partes de las flores y en la formación de órganos sexuales como son los mecanismos epigenéticos, especialmente la metilación del ADN (Negrutiu *et al.*, 2001; Vyskot y Hobza, 2004). Con base en lo anterior, el entendimiento de la determinación sexual es un proceso complejo. Por lo tanto, es posible que además de marcadores moleculares que permiten reconocer sitios específicos en los cromosomas, sea necesario el uso de otros métodos para determinar y evaluar la expresión de los genes involucrados en la determinación del sexo en diferentes estados de desarrollo de planta.

Perspectivas de este estudio

Los resultados de este estudio, utilizando los marcadores SCAR T1 y W11 combinados, permitieron diferenciar plantas hembras de plantas machos y hermafroditas. Desde el punto de vista comercial, estos marcadores son útiles para este propósito. Los resultados obtenidos consisten en un patrón molecular de bandas de ADN, característico para las plantas hembras, lo cual se muestra en la tabla 2; puesto que las combinaciones homocigotas dominantes producen cigotos letales fueron omitidas de esta tabla. El patrón observado es equivalente a las proporciones de segregación mostradas por Storey (1953), de los posibles cruces que se pueden realizar en las plantas de papaya.

Los resultados obtenidos con los marcadores SCAR T1 y W11 constituyen la base para el diseño de una metodología rápida que permita la identificación del sexo en plántulas de papaya, de dos semanas de edad, en genotipos comerciales utilizados en Colombia. Además, para programas de mejoramiento genético, esta metodología permitirá seleccionar plantas machos y hembras, en el caso de los genotipos dioicos, a muy temprana edad, que presenten características de resistencia a determinadas enfermedades y plagas para ser usadas en programas de cruzamientos.

En resumen, este trabajo abre las puertas para el diseño de una estrategia práctica de identificación de sexos en papaya de aplicación comercial. La metodología consistiría en tomar muestras pequeñas de hojas, en forma de disco, cuando la planta

tenga de tres a cuatro hojas, transferir el disco a un tubo eppendorf, agregar búfer de extracción, centrifugar y almacenar en hielo (Kasajima *et al.*, 2004). El extracto sería utilizado para preparar la reacción de PCR directamente y de esta forma se podrían analizar unas 100 plantas por día por persona. Este es el segundo trabajo que se hace en Colombia en relación con la identificación de sexos en papaya y el primero con potencial de aplicación comercial.

CONCLUSIONES

Al usar los marcadores SCAR T1 y W11 en una PCR múltiplex se logró diferenciar hembras de hermafroditas con una muestra de plantas provenientes de semilla comercial. Además, se comprobó que estos marcadores son específicos para *Carica papaya* L., puesto que no amplificaron en especies relacionadas como las del género *Vasconcella*.

Debido a que no se logró la diferenciación entre macho y hermafrodita para las variedades en estudio, se considera como desventaja para programas de mejoramiento genético, en el caso que los machos tengan características deseables.

Por último, no se observó variabilidad entre plantas machos y plantas hermafroditas, en las secuencias amplificadas con el marcador W11.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Corpoica y al Ministerio de

Tabla 2. Patrón molecular de bandas obtenido al realizar una PCR múltiplex con los marcadores T1 y W11 en los diferentes cruces de plantas de papaya (adaptado de Storey, 1953)

Cruce*	Genotipo	Proporción de segregación		
		Macho	Hembra	Hermafrodita
H X M	mm X Mm			
H X He	mm X MHm			
He autofecundado y He X He	MHm X MHm			
He X M y M X He	MHm X Mm			

* H: alelos para hembras; M: alelos para macho, MH: alelos para hermafrodita.

Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo para la realización de esta investigación. Además, a la investigadora Clara Medina (C.I. La Selva) por facilitar las muestras de papayuela; a los investigadores Gilberto Gómez (C.I. Caribia) y Buenaventura Monje (C.I. Nataima) por proporcionar muestras de papaya, y a Iván Ochoa y Laura Arango (C.I. La Libertad) por suministrar muestras de papaya del banco de germoplasma.

REFERENCIAS

- Acosta N, León G. 2003. El cultivo de papaya en el piedemonte llanero: guía de manejo para pequeños productores. Corpoica, Colombia, Boletín Divulgativo No. 10.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Celada A. 1991. Factores de transcripción y control de la expresión génica. *Investigación y Ciencia* 179: 42-51.
- Chaves G, Núñez V. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica* 153(1-2): 215-220.
- Deputy JC, 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.). *Theoretical and Applied Genetics* 106(1): 107-111.
- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. 2004. A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 22(1): 49-52.
- Kim MS, Moore PH, Zee F, Fitch MM, Steiger DL, Manshardt RM, Paull RE, Drew RA, Sekioka T, Ming R. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45(3): 503-512.
- Ko Y, Hung T, Yang W, Chang L. Specific SCAR molecular markers of sexual types in papaya. En: NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>
- Liu, Z, Moore P, Ma H, Ackerman C, Ragiba 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* 427(22): 348-352.
- Magdalita P, Mercado C. 2003. Determining the sex of papaya for improved production. Food and fertilizer technology center for the Asian and Pacific Region. University of Philippines, Los Baños (Filipinas) 6 p.
- Malo S, Campbell C. 1994. The papaya. Universidad de Florida (Estados Unidos), 3 p.
- Mandolino G, Carboni A, Forapani S, Faeti V, Ranalli P. 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98(1): 86-92.
- Negrutiu I, Vyskot B, Barbacar N, Georgiev S, Moneger F. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* 127(4): 1418-1424.
- De Oliveira EJ, Loyola JL, Da Silva M, Souza D, De Souza H, Nunes T. 2007. Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. *Pes. Agropec. Bras.* 42 (12): 1747-1754.
- Paran I, Michelmore RW. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85(8): 985-993.
- Reyes C. 2003. Los recursos genéticos de la familia Caricaceae en el mejoramiento de *Carica papaya* L. en Colombia. *Memorias Taller Internacional sobre Caricaceae. Colombia*, 1: 28-32.
- Rocha P. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Revista Palmas* 23(3): 9-17.
- Rojas Y, Ramos R, Salazar R. 1985. Posible relación del sexo con algunas características morfológicas y agronómicas de la papaya (*Carica papaya* L.). *Acta agronómica* 35(2): 20-33.
- Sánchez I, Medina C. 2003. Utilización de los marcadores moleculares en la caracterización y evaluación de la diversidad genética de Caricaceae. *Memorias Taller Internacional sobre Caricaceae. Colombia*, 1: 41-46.
- Sondur S, Manshardt R, Stiles J. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93(4): 547-553.
- Storey WB. 1953. Genetics of the papaya. *The journal of Heredity* 44(2): 70-78.
- 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*). *Theoretical and Applied Genetics* 104(2-3): 281-285.
- Vyskot B, Hobza R. 2004. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetic* 20(9): 432-438.
- Xu W, Wang B, Cui K. 2004. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Euphytica* 136: 233-238.
- Yu O, Hou S, Hobza R, Feltus A, Wang X, Jin W, Skelton RL, Blas A, Lemke C, Saw JH, Moore PH, Maqsdul A, Jiang J, Paterson AH, Vyskot B, Ming R. 2007. Chromosomal location and gene paucity of the male specific region on papaya Y chromosome. *Molecular Genetics and Genomics* 278(2): 177-185.