



# Estudio de la secuencia *ot-7* en la determinación del sexo en Lechosa (*Carica papaya* L.)

Sairo Rangel \*<sup>1</sup>✉ y Thais Castro<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Investigaciones de Biotecnología, Universidad Nacional Experimental Sur del Lago. Santa Bárbara de Zulia, Edo. Zulia-Venezuela. <sup>2</sup>Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, Universidad de los Andes. Edo. Mérida. Venezuela.

Recibido Enero-2009/aprobado Marzo.2009

---

## RESUMEN

La diferenciación sexual en plantas dioicas, es un proceso que favorece la alogamia, mediante la separación física de los gametos masculinos y femeninos. Esto se debe a la reducción o aborto de uno de los órganos sexuales de la flor originalmente bisexual, desde su fase de primordio floral, por lo que posiblemente los genes que determinan el sexo, actúen aguas abajo de la función de los genes homeóticos. *Carica papaya*, es una planta que puede mostrar tres sexos: femenino, masculino y hermafrodita, siendo las plantas masculinas las menos productivas. Actualmente no es posible determinar el sexo en estas plantas en estadios juveniles, por lo que es inevitable la existencia de plantas masculinas dentro de las plantaciones comerciales, lo que genera pérdidas económicas a los productores, haciendo necesario el desarrollo de una técnica que permita identificar el sexo en *C. papaya*, en estadios de plántulas antes del trasplante definitivo en el campo. Mediante técnicas de biología molecular se pretende abordar este problema estudiando la utilidad de la secuencia OT-7 como un marcador genético, que podría mediante un análisis en plantas juveniles identificar el sexo que presentarán en estado adulto y evitar así la siembra de plantas no productivas. Las pruebas de PCR en plantas de los tres sexos indicaron que la secuencia debía estudiarse a nivel de expresión, lo que se realizó en principio por Northern Blotting detectado colorimétricamente y posteriormente por RT-PCR, dando un resultado que difiere a pruebas quimioluminiscencias reportadas previamente en las cuales se observó una expresión diferencial de la secuencia OT-7.

**Palabras clave:** Marcador molecular, *Carica papaya*, Determinación sexual, RT-PCR, PCR, secuencia OT-7.

---

## ABSTRACT

### Study of the *ot-7* sequence in sex determination for Papaya (*Carica papaya* L.)

Sex differentiation in dioecious plants, is a process that allows allogamy through the physical separation of male and female gametes, this is due to the reduction or abortion of one of the flower sexual organs, originally bisexual, since its flower primordio phase. Then, it is possible that the genes determining sex act downstream the homeotics genes function. *Carica papaya* is a plant that can show three sexes: female, male and hermaphrodite, and the males plants are among all the less productive. Currently it is not possible to determine the sex of these plants in very young stages, so the existence of male plants within commercial crop is inevitable. This situation generates economic losses to producers and emphasizes the need to develop a technique that allows producers to identify sex in *C. papaya*, in plantlet stages before the definitive transplant to the field. Through molecular biology techniques we intend to approach this problem. Studying the usefulness of the sequence OT-7 as a genetic marker, through an analysis in young plants this sequence could help to identify the sex that plants will show in adult stage, and then avoid the sowing of non productive plants. PCR tests in plants of the three sexes indicated that the sequence should be studied at the expression level. This study was performed by Northern Blotting colorimetrically detected and then by RT-PCR, and different results were obtained from previous reports with chemiluminescent tests in which a differential expression of the OT-7 sequence was observed.

**Key words:** molecular marker, molecular Biology, sex Determination, RT-PCR, PCR, OT-7 sequence.

---

## INTRODUCCIÓN

El proceso de transición floral está determinado por la interacción de factores endógenos de la planta con el ambiente y el cambio de meristema vegetativo a meristema floral, está determinado genéticamente, seguido por todo un patrón de formación y organogénesis, llevado a cabo por genes homeóticos (Simpson *et al.* 1999). La determinación de

flores unisexuales es un proceso que promueve la alogamia masculinos y femeninos. De acuerdo a las diferentes especies, las plantas pueden tener tres posibles opciones: una es que la especie tenga los dos sexos en individuos separados (dioicas), que mantenga los dos sexos en flores del mismo individuo (monoicas), o que tengan una combinación de ambos (Tanurdzic and Banks 2004). Se ha

planteado en un principio la posibilidad de que la unisexualidad estaría controlada por la activación de la función de los genes homeóticos (Dellaporta and Calderon-Urrea 1993), pero se ha encontrado que la unisexualidad está causada por la reducción o aborto de los primordios de uno de los órganos sexuales, por lo que cabe la posibilidad que los genes que determinan el sexo, actúen aguas abajo de la función de los genes homeóticos. Consistente con esta idea se ha encontrado en estudios morfológicos de plantas unisexuales, que éstas han pasado por un estado de bisexualidad en el que ambos sexos son iniciados, entonces cabe pensar que la formación de flores unisexuales a partir de meristemas bisexuales requiere la acción de genes que determinan el sexo (Kater *et al.* 2001).

Liu *et al.* (2004) ha señalado la existencia de cromosomas sexuales en lechosa (*Carica papaya* L), donde el cromosoma Y llamado LG1 contendría los genes que determinan el sexo en una región estimada en 4.4 Mb o el 10% del cromosoma total mediante el mayor distanciamiento de los gametos. Esta planta posee aproximadamente 14 tipos sexuales entre los cuales se encuentran: femenino, masculino y hermafrodita, siendo los masculinos, los menos utilizados

con propósitos económicos por no ser productivos (Avilán y Rengifo, 1986). En estado vegetativo no es posible determinar el sexo por lo que es constante la existencia de plantas económicamente no productivas en cultivos comerciales, lo que hace necesario el desarrollo de una técnica que permita identificar el sexo a nivel de plántulas. Urasaki *et al.* (2002) reportó un marcador específico RAPD de plantas masculinas y hermafroditas, que convertida en un marcador SCAR (sequence-characterized amplified region), permite una rápida identificación del sexo en *C. papaya*, presentando evidencia de que este marcador está ubicado en segmentos del cromosoma específico para masculinos y hermafroditas.

En trabajos anteriores desarrollados con la finalidad de relacionar las hormonas en la determinación sexual de lechosa, Castro (2002) obtuvo una secuencia de 450pb (OT-7) cuya expresión observada por métodos quimioluminocentes fue diferencial entre los primordios de flores hermafrodita, masculina y femenina. Con la finalidad de conocer si esta secuencia puede ser empleada como un marcador sexual, se pretende emplear diferentes técnicas moleculares en tejido tanto foliar como floral para confirmar a rechazar dicha interrogante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Hojas, primordios florales de *Carica papaya* L. aproximadamente 1,5 cm y flores de tres plantas de la variedad larga roja provenientes del invernadero de la Universidad de los Andes ubicada en el Estado Mérida.

### Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método modificado de Dellaporta *et al.* (1985), que consiste en pesar 200 mg de tejido foliar y triturarlo en un mortero con Nitrógeno líquido, para posteriormente adicionarle 400 µl de tampón de extracción (Urea 7M, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 20 mM y 1% Sarcosil) homogenizando suavemente, se añadieron 500 µl de una mezcla Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico, se centrifugó la mezcla a 13000 rpm por 15 min y al sobrenadante se agregaron 150 µl de una solución de Acetato de Amonio 10 M, se añadió 0,6 volumen de isopropanol y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se lavó con etanol 70%, se centrifugó a 13000 rpm por 15 min y se le agregó 200 µl de tampón TE suplementado con 5 µg de RNAsa, se colocó un volumen de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico y se precipitó el ADN con 0,1 volumen de CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol 100%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100 µl de tampón TE.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron iniciadores o cebadores LTC2Fw cctcagctagatcctactgtttgccagc y LTCRev aacctaaccggaatcaggaattcagacgt con la mezcla de reacción: ADN 10 ng, Buffer10X 5,0 µl, dNTPs 1,0 µl, MgCl<sub>2</sub> 6,0 µl, iniciador 3' 0,5 µl, iniciador 5' 0,5 µl, Taq 0,032 U, H<sub>2</sub>O a un volumen final de 50 µl y el programa utilizado consistió en 95°C de desnaturalización por dos min y 30 ciclos de 94°C por un min (Desnaturalización), 52°C por un min (Alineamiento), 72°C por 2,5 min (Extensión) y posteriormente una extensión

final de 72°C por 10 min. Corrido posteriormente en Gel de agarosa 1,5% en Tampón TBE 0,5X por una h a 90 Voltios

### Extracción de ARN

Fue utilizado el método de Napoli *et al.* (1990), para ello se pesaron 200 mg de tejido, se pulverizaron en un mortero mediante el uso de nitrógeno líquido, se transfirió a un tubo eppendorf conteniendo 150 µl de fenol saturado con Tris pH 7,5 y 500 µl de solución R, (NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y SDS 1%), posteriormente se agregó 250 µl de cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1), se centrifugó a 13.000 rpm por 15 min y a la fase acuosa se precipitó el ARN con la adición de un volumen de cloruro de litio 5M, se dejó por 3h a 0°C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se resuspendió el pellet en agua y se precipitó con Acetato de Sodio 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100%, el pellet de ARN fue luego resuspendido en agua con DPC. Se tomaron 30 µg de ARN.

### Northern Blotting

El ARN posteriormente fue hibridado toda la noche con una sonda de ADN marcada con digoxigenina correspondiente a la secuencia OT-7 y se reveló mediante el uso del Kit DIG Nucleic Acid Detection No.11175041910.

### RT-PCR

Se realizó con una mezcla para la síntesis de la primera cadena que consistió en: tampón RT 9600 gold, dNTPs 10 mM, iniciador LTC2 Rev, Inhibidor de ribonucleasas, 20-25 U/µl AMV RT y 1 µg de ARN total. Se incubó a 37°C por 30

seg, se detuvo la reacción inactivando a 95°C por cinco min y colocando inmediatamente en hielo. La síntesis de segunda cadena se realizó con: Tampón de reacción AMV 1X, dNTPs 0,2 mM, iniciadores 50 pm, MgSO<sub>4</sub> 1mM, Taq 0,1U/µl y ADNc 100 ng.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio de la secuencia OT-7 a nivel de ADN

En la Figura 1, podemos observar las muestras de la PCR de diferentes órganos vegetales dando un amplificado de unos 150 pb en todas las muestras analizadas. En nuestro interés por encontrar un marcador molecular en *Carica papaya* que permita determinar el sexo en plantas jóvenes, decidimos estudiar la secuencia OT-7 que ha sido referenciada como un posible candidato para tal objetivo, por lo que como estrategia, comenzamos estudiándola a nivel de ADN a través de la PCR, observándose que dicha secuencia está presente en todos los tipos sexuales utilizados, por lo que cabe señalar que no puede ser utilizada como marcador genético en ADN, procediéndose entonces a estudiar su expresión.



**Figura 1.** Gel de agarosa al 1,5% con muestras de la PCR. 1flor femenina, 2 flores hermafroditas, 3 flores masculinas, 4 hojas femeninas, 5 hojas hermafroditas, 6 hojas masculinas, 7 controles positivos, 8 controles negativos, PM escalera de peso molecular.

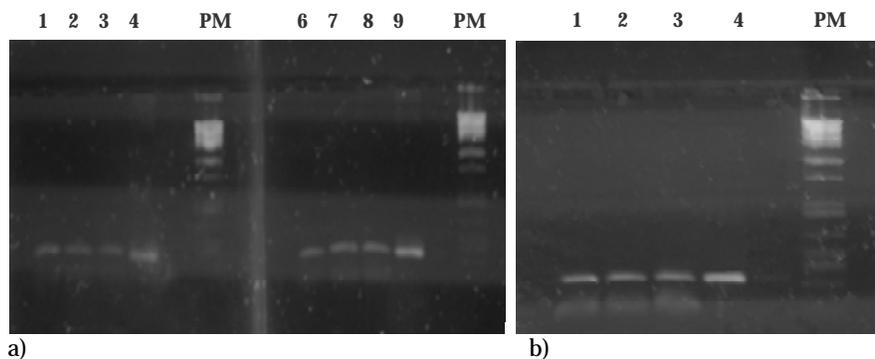
### Análisis de ARN

En primer término se utilizó la técnica de Northern Blotting usando como sonda un amplificado de 150 pb correspondiente a la parte interna de la secuencia y se detectó coloriméricamente la hibridación con el ARN mensajero del gen, observándose que solo ocurre hibridación con la sonda en los controles positivos (resultados no presentados), lo que nos indica, que el nivel de expresión de esta secuencia es muy bajo y es necesaria la utilización de métodos más sensibles que permitan medirlo, seguidamente se realizó un RT-PCR

con el que se evidenció la expresión, pero observándose niveles similares en todos los tipos sexuales utilizados (fig 2); aunque éstos no fueron los resultados esperados pueden ser explicados ya que según Urasaki *et al.* (2002) el SCAR por él reportado, que permite diferenciar las plantas femeninas de los demás tipos sexuales, puede variar entre variedades e incluso entre poblaciones de *C. papaya*, entonces esta reproducibilidad es poco probable.

Como la secuencia SCAR reportada por Urasaki *et al.* (2002) corresponde a una región interna al cromosoma Y de *C. papaya*, buscamos una secuencia en el GenBank con similares características para estudiarla a través de la PCR, seleccionando a la cpsm64 la cual dio resultados idénticos a los obtenidos con la OT-7 (resultados no presentados) siendo en esta secuencia de poca utilidad para nuestro fin. Estudios hechos en *C. papaya* por Liu *et al.* (2004) indican que el sexo está bajo el control de un único gen con tres alelos, seña además al igual que Vyskot y Hobza, (2004) con base en mapeo de alta densidad que se ha encontrado un alto nivel de polimorfismo en una región genómica que rodea el locus del sexo, que indican además que este gran polimorfismo nos pueden generar una gran variedad de marcadores que cosegregan con los diferentes tipos sexuales. Lo señalado por esos autores podría-entonces hacernos pensar que ese alto polimorfismo representa una fuente de variabilidad en esa región genómica para una población específica, por lo que los marcadores moleculares pueden ser constantes en plantas de la misma población pero posiblemente no para otras poblaciones.

En las estrategias para determinar el sexo en plantas de *C. papaya* en Venezuela se debe primero seleccionar el material vegetal más adecuado con fines de interés agrícola con variedades adaptadas a todas las zonas productoras del país y posteriormente usar técnicas de biología molecular como: Microsatélites, AFLP y RAPD para evidenciar polimorfismo y generar marcadores SCAR, si bien esto inicialmente represente altos costos, la tecnología final que llegará a los productores constará de sólo una prueba de PCR. En las Figuras 2: a y b observamos el resultado obtenido en el RT-PCR de los tejidos de flor, hoja y primordios foliares que demuestran la expresión de la secuencia OT-7 igual en todos los tipos sexuales y en todos los órganos estudiados encontrándose un amplificado de 150 pb.



**Figura 2.** a) Gel de agarosa 1.5% con RT-PCR de la secuencia OT-7. 1 flor femenina, 2 flores hermafroditas, 3 flores masculinas, 4 control positivo, PM Peso Molecular, 6 hojas femeninas, 7 hojas hermafroditas, 8 hojas masculinas, 9 control positivo, PM Peso Molecular. b). Gel de agarosa al 1,5%. RT-PCR de la secuencia OT-7. 1 primordio de flor femenina, 2 primordios de flores hermafroditas, 3 primordios de flores masculinos, 4 control positivo, PM escaleras de peso molecular.

---

## CONCLUSIONES

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta práctica para el estudio de la secuencia OT-7, la cual está reportada como posible marcador molecular para determinar el sexo en *C. papaya* L y la cpsm64 que está reportada como una secuencia específica del cromosoma Y de esta planta. Los resultados infructuosos para la utilidad de

estas secuencias con el objetivo de determinar el sexo en plantas jóvenes nos indican que se deben utilizar primeramente técnicas de biología molecular como: Microsatélites, AFLP y RAPD para evidenciar polimorfismo y generar marcadores SCAR en variedades de interés en Venezuela.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**Avilán, L.** y Rengifo, C. (1986). El Lechoso. Editorial América C.A. Caracas Venezuela. Pg. 21-34.

**Castro, T.** (2002). Estudio Morfológico de Flores Estaminadas, Pistiladas, Hermafroditas y Cloneo de Genes de *Carica papaya* L. Tesis de Magister Scientiae en Biología Celular. Universidad de los Andes. Mérida Venezuela. 120 Pg.

**Dellaporta, S.** and Calderon-Urrea, A. (1993). Sex Determination in Flowering Plants. *The Plant Cell*, 5:1241-1251.

**Dellaporta, S.,** Wood, J., and Hick, J. (1985). A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1(4): 19-21.

**Kater, F.,** Carney, K., Colombo, L. and Angenent, G. (2001). Sex Determination in the Monoecious Species Cucumber is Confined to Specific Floral Whorls. *The Plant Cell*, 13:481-493.

**Liu, Z.,** Moore, P., Ma, H., Ackerman, C., Ragiba, M., Yu, G., Pearl, H., Kim, M., Charlton, J., Stiles, J., Zee, F., Peterson, A. and Ming, R. (2004) A primitive Y Chromosome in Papaya Marks

Incipient Sex Chromosome Evolution. *Nature*, 247: 348-352.

**Napoli, C.,** Lemieux, C. y Jorgensen., R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene Into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous genes in Trans. *The Plant Cell*, 2:279-289.

**Simpson, G.,** Gendall, A., Anthony, R. y Deam C. (1999). When to Switch to Flowering. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 99:519-550.

**Tanurdzic, M.** y Banks, J. (2004). Sex-Determining Mechanisms in Land Plants. *The Plant Cell*, 16:S61-S71.

**Urasaki, N.,** Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Rayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I. y Terauchi, R. (2002). A Male and Hermaphrodite Specific RAPD Marker for Papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104:281-285.

**Vyskot, B.** y Hobza, R. (2004). Gender in Plants: Sex Chromosomes Are Emerging from the Fog. *Trends Genet.* 20(9):432-438

