



Análisis de curvas de fusión de alta resolución para identificar el sexo en papaya (*Carica papaya* L.)¹

High-resolution melting curve analysis to identify sex in papaya (*Carica papaya* L.)

Walter Barrantes-Santamaría², Elodia M. Sánchez-Barrantes²

¹ Recepción: 20 de octubre, 2021. Aceptación: 17 de enero, 2022. Este trabajo formó parte del proyecto “Mejoramiento genético de la papaya”, inscrito en la vicerrectoría de investigación de la Universidad de Costa Rica.

² Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Laboratorio de Biología Molecular, Alajuela, Costa Rica. walter.barrantes@ucr.ac.cr (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-5288-451X>), elodia.sanchez@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-5288-451X>).

Resumen

Introducción. El sexado de las plantas de papaya (*Carica papaya* L.) en plantaciones comerciales se suele hacer de forma visual una vez que la planta emite la flor. También existen procedimientos biotecnológicos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizados para detectar a edades tempranas el sexo de la papaya, sin embargo, ambos métodos mencionados presentan una serie de inconvenientes entre ellos los falsos positivos. **Objetivo.** Identificar el sexo en plántulas de papaya con marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de alto grado de precisión. **Materiales y métodos.** La investigación se realizó en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica, durante los meses de febrero a octubre del año 2020. Se evaluaron ocho marcadores SNP en plantas de papaya de sexo conocido mediante la técnica HRMA (siglas en inglés: High Resolution Melting Analysis), se escogió el mejor y se reevaluó en dos poblaciones del programa de mejora genética de este cultivo, las plantas sexadas se sembraron en campo para comparar el sexado molecular con el real en campo. **Resultados.** Varios de los marcadores SNP evaluados fueron polimórficos y podrían ser usados para identificar el sexo en la papaya, sin embargo, el marcador CpSERK_HRM_34704 fue el que se ajustó más a los criterios de selección. **Conclusión.** Para el caso del híbrido de papaya Pococí y poblaciones de mejora emparentadas con el mismo, el marcador CpSERK_HRM_34704 mostró un 100 % de precisión entre el sexado molecular de las plántulas en el almacigo con la técnica HRM y el sexo real de las mismas plantas sembradas en el campo.

Palabras clave: temperatura de fusión, nucleótido de polimorfismo único, fusión de alta resolución, fitomejoramiento.

Abstract

Introduction. The sexing of papaya plants (*Carica papaya* L.) in commercial plantations is usually done visually once the plant emits the flower. There are also biotechnological procedures such as the Polymerase Chain Reaction (PCR), used to detect the sex of papaya at early ages, however, both methods mentioned above present a series of drawbacks, among them false positives. **Objective.** To identify sex in papaya seedlings using SNP (Single Nucleotide



Polymorphism) markers with a high precision. **Materials and Methods.** The research was carried out at the Fabio Baudrit Moreno Agricultural Experiment Station of the Universidad de Costa Rica, during the months of February to October, 2020. Eight SNP markers were evaluated in papaya plants of known sex using the HRMA (acronym in English: High Resolution Melting Analysis) technique, the best one was chosen and reevaluated in two populations of the genetic improvement program of this crop, then the sexed plants were sown in the field to compare the molecular sexing with the current field sexing. **Results.** Several of the SNP markers evaluated were polymorphic and could be used to identify sex in papaya, however, the marker CpSERK_HRM_34704 was the one that most closely matched the selection criteria. **Conclusion.** In the case of the papaya hybrid Pococi and related breeding populations, the marker CpSERK_HRM_34704 showed 100 % precision between the molecular sexing of the seedlings in the nursery using the HRM technique and the current sex of the same plants planted in the field.

Keywords: melting temperature, single polymorphism nucleotide, high-resolution melting, plant breeding.

Introducción

El árbol de papaya (*C. papaya* L.), produce uno de los frutos más cultivados y consumidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Da Silva et al., 2007). Esta especie pertenece a la familia Caricaceae, la cual consta de cuatro géneros. El género *Carica* es el único que se cultiva como árbol frutal. Su cultivo es de gran importancia económica en países como Brasil, México, Nigeria, Indonesia, India, Etiopía, Congo, Perú y China, que representan los principales productores de papaya (Anandan et al., 2011).

Esta especie se caracteriza por ser diploide, posee nueve pares de cromosomas y su genoma consiste en 372 Mb (Ming et al., 2008). Las plantas adultas presentan tres posibles formas sexuales: masculinas, femeninas y hermafroditas, cada una de ellas en plantas separadas (Urasaki et al., 2012). Según la hipótesis genética de la determinación del sexo, en la papaya este está controlado por un solo locus, *Sex1*, que consta de tres alelos: *M1*, un alelo dominante para plantas masculinas; *M2*, un alelo dominante diferente para plantas hermafroditas; y *m*, un alelo recesivo de las plantas femeninas (Chen et al., 2019).

Las poblaciones derivadas de la polinización cruzada entre hembras y hermafroditas segregan en una proporción de 1 hermafrodita (H): 1 hembra (F), mientras que la progenie derivada de una hermafrodita cruzada con otra hermafrodita y de plantas hermafroditas auto polinizadas producirían una proporción de segregación 2 H: 1 F (Chen et al., 2019). En muchas regiones del mundo, existe un creciente interés en la industria agrícola en obtener árboles con flores hermafroditas, ya que estos producen frutos con mejores características comerciales, como son forma del fruto periforme, una cavidad interior pequeña y una piel gruesa que les da resistencia a los daños mecánicos postcosecha (Saalau et al., 2009), mientras que el uso de árboles hembras para la producción, implica la pérdida de 6 a 10 % del espacio de campo en el cultivo de árboles masculinos para polinizar a las hembras.

En Costa Rica el principal híbrido cultivado es Pococí, el cual se caracteriza por ser de alto rendimiento, con frutos de buen sabor de entre 1 y 1,5 kg de peso. Al igual que la mayoría de los híbridos comerciales, son ginodioicos y se segregan en una proporción de 1:1 para plantas hembras y hermafroditas (Araya et al., 2019), lo que provoca que un 50 % de las plantas obtenidas sean femeninas, esto significa que los productores deben sembrar de tres a cuatro plantas por punto de siembra y luego, por métodos convencionales, hacer el sexado de las plantas al momento de la floración, para obtener una plantación con genotipos en su mayoría hermafroditas (Bogantes et al., 2011). Este método de sexado visual, es poco eficiente e implica pérdidas por el descarte de las plantas hembra, además de un mayor costo en la mano de obra durante la siembra, mantenimiento y sexado visual de las plantas (Barrantes et al., 2019).

Debido a la naturaleza heterocigota del genotipo hermafrodita en papaya, es imposible obtener una variedad 100 % con este genotipo (Mora & Bogantes, 2005). Sin embargo, en la actualidad existen metodologías biotecnológicas para sexar las plantas y cultivar solo las hermafroditas. Una de ellas es mediante el uso de los marcadores moleculares, los cuales permiten determinar el sexo de la planta desde la etapa de plántula, previo a la siembra en el campo. Para el caso del híbrido Pococí, se ha utilizado el marcador W11 tipo SCAR's (Secuencias Caracterizadas Amplificadas al Azar) diseñado por Deputy et al. (2002). En un primer ensayo este marcador se usó para determinar el sexado de 1500 plántulas mediante PCR en tiempo final, los resultados fueron visualizados en geles de agarosa (Salaau et al., 2009). En el año 2019, se evaluó este mismo marcador y el marcador SDP diseñado por Urasaki et al. (2002), ambos permitieron el sexado de las plantas mediante la PCR en tiempo final y de forma multiplex (Araya et al., 2019). Sin embargo, este procedimiento de sexado de almácigos mediante PCR en tiempo final resulta lento y laborioso, debido a la gran cantidad de geles de agarosa que se deben realizar para visualizar los resultados.

El análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRMA, por sus siglas en inglés High-Resolution Melting Analysis), es una nueva técnica post-PCR, que se ha implementado para el genotipado de plantas. HRM tiene varias ventajas sobre otras tecnologías: es más simple, flexible, es no destructivo, de alta sensibilidad, específico, rentable y muy preciso (Kafkas et al., 2015; Simko, 2016), al ser un proceso continuo, en un solo análisis en el termociclador se pueden genotipar las plantas, sin necesidad de hacer la etapa de la electroforesis y, así, ahorrar tiempo y recursos. Además, estos marcadores no se ven afectados por las condiciones ambientales en las que crecen las plantas ni por la epistasia, por lo que la predicción del sexo se puede realizar en cualquier etapa de desarrollo del crecimiento de las plantas (Bekheet et al., 2007; Bhargava & Srivastava, 2019).

La precisión en el genotipado con la técnica HRM, está determinada por la forma de la curva derivada de fusión y la temperatura de fusión (*tm*) de los amplicones. La *tm* es aquella en la cual la mitad del ADN está como cadena sencilla y la otra mitad como cadena doble. Con estas dos características bien definidas se puede asociar al 100 % un marcador SNP a algún carácter en las plantas (Han et al., 2012). En este caso a la identificación del sexo en estadios tempranos de la papaya, labor de gran importancia a nivel de producción comercial y económico (Chen et al., 2019).

El objetivo de este trabajo fue lograr identificar el sexo en plántulas de papaya con marcadores tipo SNP de alto grado de precisión.

Materiales y métodos

El experimento se desarrolló durante los meses de mayo a agosto del año 2020 en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM) de la Universidad de Costa Rica, dicha estación se localiza a una Latitud de: 10°00'26,4" N y una longitud de 84°15'57,4" O, a una altitud de 859 m s.n.m., en la zona de la Garita de Alajuela-Costa Rica (Google, s.f.).

Material vegetal y extracción de ADN

El material vegetal consistió en hojas jóvenes de plantas de papaya. El tejido fue colectado en tubos plásticos de 1,5 mL y se mantuvo con hielo hasta su llegada al Laboratorio de Biología Molecular, ubicado en la EEAFBM.

Se hicieron dos tipos de colectas de tejido, la primera se realizó en doce plantas adultas de sexo conocido del híbrido de papaya Pococí, el objetivo fue evaluar ocho marcadores SNP de este cultivar; luego, se realizó un segundo muestreo a nivel de almácigo, para evaluar dos poblaciones de cien plántulas cada una, ambas provenientes del programa de mejora genética de papaya de la EEAFBM, en este caso el objetivo fue medir la precisión del marcador seleccionado en el primer experimento.

En los dos tipos de colecta, se tomó una muestra de entre 50 y 60 mg de tejido foliar joven, el cual se liofilizó en el equipo BK-FD10S (Biobase Biodustry, Shandong), durante 24 h. Luego, se procedió a la extracción de ácidos nucleicos. Se utilizó el método Doyle y Doyle (1990) con modificaciones, el cual se detalla de la siguiente manera: ~30 mg de tejido de hoja liofilizada se depositaron en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, a cada tubo se agregó un balín de acero inoxidable estéril y se trituró en el macerador Geno/Grinder 2010 (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ, USA) por 2 min. Se agregó 400 μ L de buffer de extracción (20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris (pH 8,0), 2 % PVP, 2 % CTAB, 1,4 M NaCl y 0,2 % v/v β -mercaptoetanol), se mezclaron con vortex, luego se incubaron a 65 °C por 30 min; después de este tiempo se agregó 400 μ L de una solución de cloroformo:fenol (24:1) a cada tubo y se homogenizaron por inversión. Los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió 250 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, y a cada uno de estos tubos, se les agregó 250 μ L de isopropanol frío (-20 °C), se homogenizaron por inversión y se dejaron reposar por 10 min a -20 °C. Se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min a -4 °C y se descartó el isopropanol. El pellet se lavó con 500 μ L de etanol 70 % frío y se centrifugó por 2 min a 13 000 rpm. Se descartó el etanol y se realizó un segundo lavado con 500 μ L de etanol 70 % frío. Se puso a secar el pellet a 42 °C por 20 min y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas junto con 1 μ L de ARNasa (conc. solución stock 10 mg mL⁻¹) y se incubó a 37 °C por 30 min. El ADN aislado se cuantificó a nivel espectrofotométrico en el NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., US) y se diluyó a ~80 ng μ L⁻¹. La calidad y rendimiento de ADN genómico se determinó en un gel de agarosa al 1 % corrido en TBE 0,5X (30 min / 100 V).

Validación de los marcadores SNP ligados al sexo de la papaya mediante análisis de fusión de alta resolución (HRMA)

Se llevó a cabo la validación de ocho marcadores reportados por Lee et al. (2018), para la determinación de sexo en papaya. La amplificación por PCR y el HRM se realizó en un termociclador marca Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany). La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 10 μ L que contenía 2 μ L de ADN, 5 μ L de MeltDoctor™ HRM Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2,3 μ L de agua libre de nucleasas, 0,35 μ M del imprimador forward y 0,35 μ M del imprimador reverse (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencias de los imprimadores SNP desarrollados por Lee et al. (2018), usados para identificar el sexo de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.), mediante la técnica HRM. Laboratorio de Biología Molecular, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

Table 1. Sequences of the SNP primers developed by Lee et al. (2018), used to identify the sex of papaya seedlings, using the HRM technique. Molecular Biology Laboratory, Fabio Baudrit Moreno Agricultural Experimental Station, University of Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

Imprimadores	Forward	Reverse	Tm
CpCAF1AL_HRM_02	TGCCTCCATCTGATACAAGTA	AACTAGTCTGCCCTGTG	57,4/56,1
CpCAF1AL-HRM_04	GAAGATGAATGTGCAGATGG	AGGATGTCCATTAGCTCAAA	56,4/54,3
CpSERK_HRM_34787	TAGCTGATGGTACACTAGTA	TCTACTTCTGTCTGAAACTG	54,3/54,3
CpCAF1AL_HRM_01	CTGTTAGCAGGTAAAGGC	TGTATCAGATGGAGGCAT	53,9/51,6
CpSERK_HRM_34072	CTCCTCCACCATTTGTTC	GCTATTGATGTGTTGCTAC	53,9/53,0
CpSERK_HRM_34760	TTTTGGGTAGAGGAGGATTT	AGCTACTAGTGTACCATCAG	54,3/56,4
CpSVPL_HRM88	AATAAAATGCATAATTACATAGCACAG	AGAAAGGTCAGTTACCACATAA	59,2/57,5
CpSERK_HRM_30704	TTCATTGAGATGCGTATTG	GTCATCACAAGTAAAGTC	50,9/53,0

Los imprimadores se separaron en dos grupos de cuatro cada uno, para realizar la amplificación por PCR de acuerdo con su temperatura de anillado. En el grupo 1 se encontraban los marcadores CpSERK_HRM_34787, CpSERK_HRM_34072, CpCAF1AL_HRM_01 y CpSERK_HRM_30704, la amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min; 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 60 s y el HRM con un incremento de temperatura de 67 °C a 87 °C, a una velocidad de 0,1 °C / 2 s, para la detección de fluorescencia de cadenas dobles de ADN.

En el grupo 2 se encontraban los imprimadores CpCAF1AL_HRM_02, CpCAF1AL_HRM_04, CpSERK_HRM_34760 y CpSVPL_HRM88, la amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min; 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s y el HRM con un incremento de temperatura de 67 °C a 87 °C, a una velocidad de 0,1 °C por 2 s, para la detección de fluorescencia de cadenas dobles de ADN.

Sexado de poblaciones de mejora de papaya

De los imprimadores evaluados mediante el procedimiento PCR/HRM, en plantas de papaya del híbrido Pococí de sexo conocido, se seleccionó el que diferenció mejor entre hembras y hermafroditas. Para la selección se utilizaron tres criterios: 1) que mostrara polimorfismo entre ambos genotipos, 2) presencia de una sola cresta en la curva derivada de fusión en plantas femeninas (homocigotas) y dos crestas en la curva derivada de fusión en plantas hermafroditas (heterocigotas) y 3) que la diferencia de *tm* (temperatura de fusión) entre genotipos fuera como mínimo de 0,5 °C.

Las condiciones de PCR-HRM para esta etapa fueron determinadas en el primer análisis para el marcador seleccionado, las plantas de las poblaciones sexadas con el marcador SNP seleccionado fueron plantadas en un invernadero ubicado en la EEAFBM, donde se mantuvieron hasta la floración, momento en donde se analizó la concordancia entre el sexado molecular y el sexo real de cada planta.

Resultados

Selección del imprimador SNP para el sexado mediante HRM

Los ocho imprimadores tipo SNP utilizados en este ensayo y ligados al sexo en plantas de papaya amplificaron para el híbrido comercial Pococí. Sin embargo, cuando se evaluaron en los otros criterios de selección se presentaron diferencias.

En el caso del grupo 1, el imprimador CpSERK_HRM_34787 fue polimórfico y logró diferenciar ambos genotipos (hembras/hermafroditas), sin embargo, la *tm* de las curvas fue muy cercana entre ambas, por lo que la cresta mayor de la curva hermafrodita quedó dentro de la curva femenina. El marcador CpCAF1AL_HRM_01, a pesar de ser polimórfico, la curva de fusión que corresponde al fenotipo femenino presentó varios amplicones, esta morfología de la curva difirió de la observada en los demás marcadores evaluados (Figura 1), por lo tanto, es un marcador poco fiable para ser usado en el sexado. En el caso de CpSERK_HRM_34072, la curva correspondiente al genotipo hermafrodita no tuvo las dos crestas bien definidas, lo que podría representar confusión a la hora de genotipar y dar falsos positivos de plantas femeninas, además, la diferencia de la *tm* entre las curvas fue muy pequeña. Asimismo, ninguno de estos tres imprimadores cumplió con los requisitos de selección para sexar plantas del híbrido Pococí. El imprimador CpSERK_HRM_34704 sí cumplió con todos los criterios de selección: fue polimórfico, diferenció entre ambos genotipos, con curvas derivadas de fusión bien definidas para femeninas y hermafroditas. Además, las *tm*'s fueron suficientemente diferentes para poder distinguir los genotipos (Figura 1).

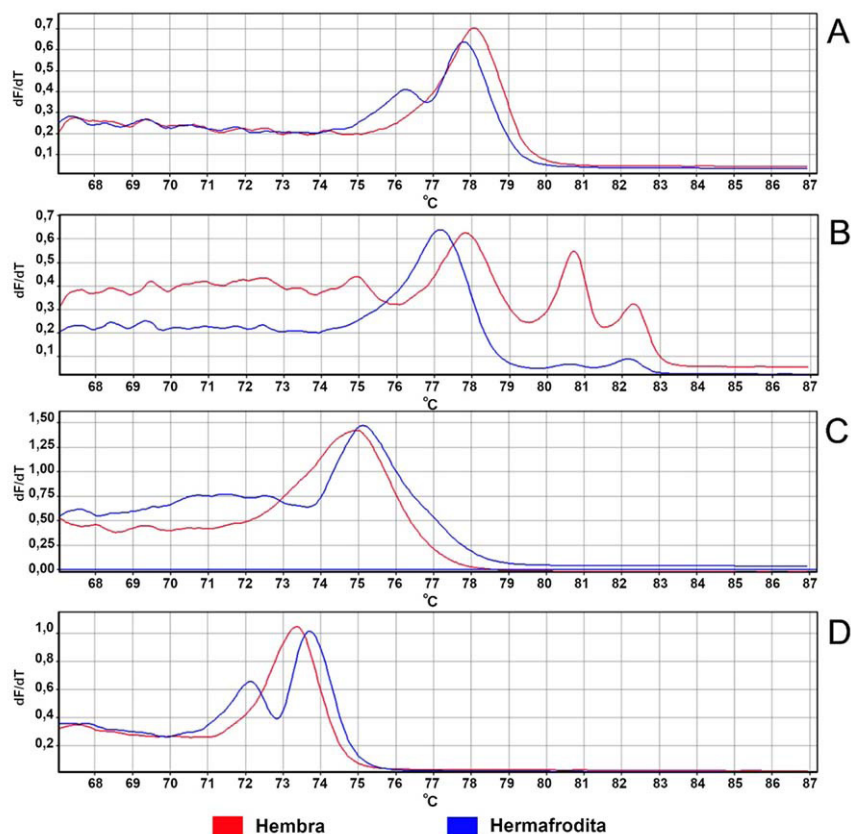


Figura 1. Curvas derivadas de fusión, obtenidas en plantas de papaya (*Carica papaya* L.), mediante el análisis HRM con imprimadores tipo SNP específicos para sexado de papaya del grupo 1: **A.** CpSERK_HRM_34787, **B.** CpCAF1AL_HRM_01, **C.** CpSERK_HRM_34072, **D.** CpSERK_HRM_34704. Laboratorio de Biología Molecular, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno. Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

La curva azul genotipo hermafrodita y la curva roja genotipo femenino.

Figure 1. Derived melt curves obtained in papaya (*Carica papaya* L.) plants by HRM analysis using SNP-type markers specific for group 1 papaya sexing: **A.** CpSERK_HRM_34787, **B.** CpCAF1AL_HRM_01, **C.** CpSERK_HRM_34072, **D.** CpSERK_HRM_34704. Molecular Biology Laboratory, Fabio Baudrit Experimental Station, University of Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

The hermaphroditic genotype blue curve and the female genotype red curve.

En el caso del grupo 2 de imprimadores: 9CpCAF1AL_HRM_02, CpCAF1AL_HRM_04, y CpSERK_HRM_34760 fueron polimórficos, pero con crestas poco definidas, además, las curvas derivadas de fusión no tuvieron la forma típica para cada genotipo. El marcador CpSVPL_HRM_88r fue el único que no mostró polimorfismo en los genotipos, se pudo observar que ambas curvas derivadas de fusión presentaron una sola cresta con una misma morfología, lo que no permite diferencias entre hembras y hermafroditas (Figura 2).

Precisión del imprimador seleccionado mediante HRM

El imprimador CpSERK_HRM_34704 fue el que se ajustó más a los criterios de selección y destacó por la estética de la curva. Por ello, se eligió para realizar el sexado de dos poblaciones del programa de mejoramiento

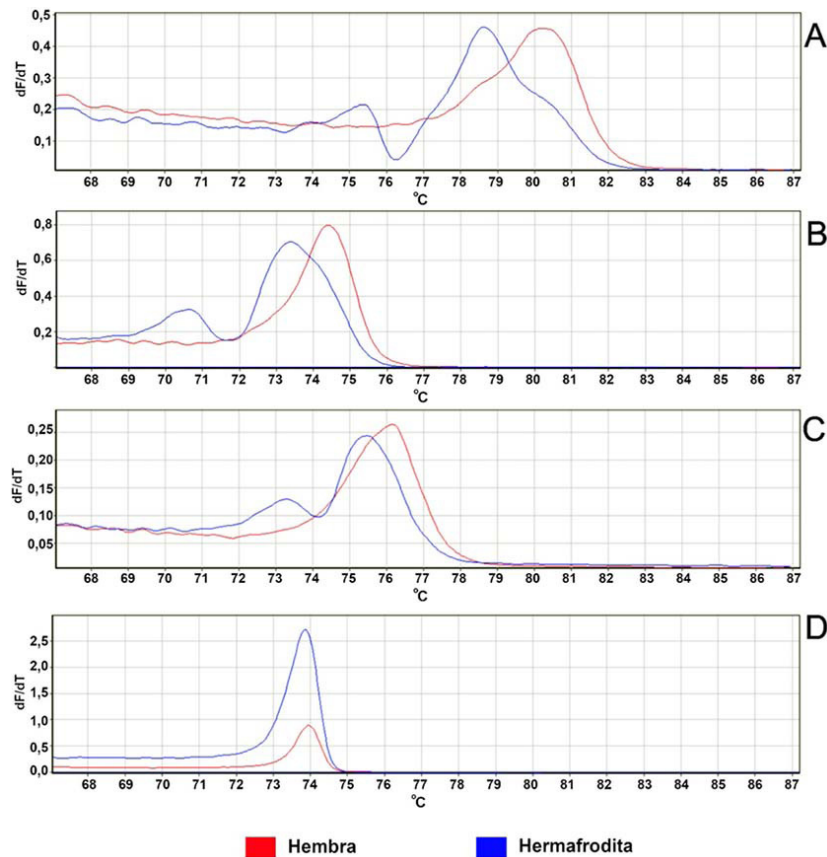


Figura 2. Curvas derivadas de fusión, obtenidas en plantas de papaya (*Carica papaya* L.), mediante el análisis HRM con marcadores tipo SNP específicos para sexado de papaya del grupo 2: **A.** CpCAF1AL_HRM_02, **B.** CpCAF1AL_HRM_04, **C.** CpSERK_HRM_34760, **D.** CpSVPL_HRM_88r. Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno. Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

La curva azul genotipo hermafrodita y la curva roja genotipo femenino.

Figure 2. Derived melt curves obtained in papaya (*Carica papaya* L.) plants by HRM analysis using SNP-type markers specific for group 2 papaya sexing: **A.** CpCAF1AL_HRM_02, **B.** CpCAF1AL_HRM_04, **C.** CpSERK_HRM_34760, **D.** CpSVPL_HRM_88r. Molecular Biology Laboratory, Fabio Baudrit Experimental Station, University of Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

The hermaphroditic genotype blue curve and the female genotype red curve.

genético de papaya. La amplificación resultó exitosa y el análisis post PCR (HRM) demostró ser eficaz para diferenciar entre los genotipos femeninos y hermafroditas en dos poblaciones diferentes. En la Figura 3A y 3B, se visualiza el patrón de la curva derivada femenina, que muestra una sola cresta de naturaleza homocigota y una *tm* de 75,6 °C, mientras que el genotipo hermafrodita muestra un patrón de dos crestas de naturaleza heterocigota con un *tm* de 74,95 °C.

Las características de los amplicones obtenidos con el imprimador CpSERK_HRM_34704 en todas las plántulas de papaya, se evaluaron al trazar además de la curva derivada de fusión, otras dos curvas para verificar los datos y estas fueron: la curva de fluorescencia normalizada (Figura 4A) y la curva de fusión de diferencias de temperaturas (Figura 4B). Solo se muestran las curvas correspondientes a la población 1, sin embargo, en ambas poblaciones se produjeron gráficos diferentes que fueron distinguibles para cada genotipo estudiado. Al igual que cuando se usó la curva derivada de fusión, el sexo de las plantas pudo ser separado en hembras y hermafroditas al analizar las curvas adicionales.

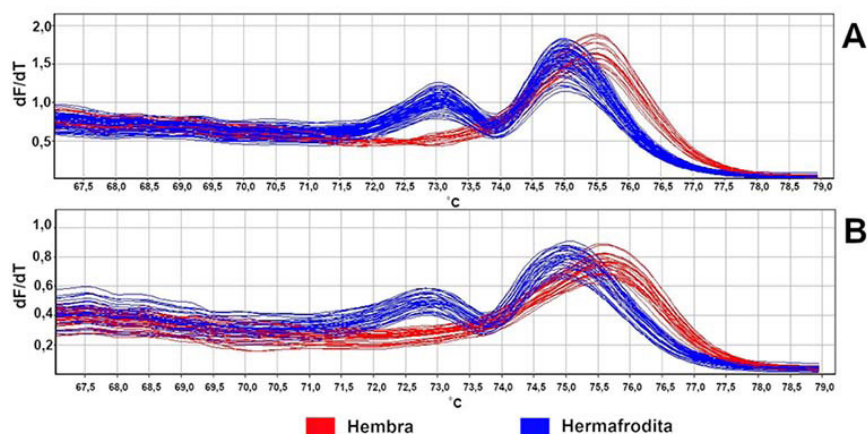


Figura 3. A y B: Curvas derivadas de fusión de plantas hembra y plantas hermafroditas en dos poblaciones diferentes (A y B) de papaya (*Carica papaya* L.). Amplificaciones obtenidas mediante el marcador SNP CpSERK_HRM_34704, con la técnica HRM. Laboratorio de Biología Molecular, Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

Figure 3. A and B: Derived melt curves of female plants and hermaphroditic plants in two different populations (A and B) of papaya (*Carica papaya* L.). Amplifications obtained by the SNP marker CpSERK_HRM_34704, with the HRM technique. Molecular Biology Laboratory, Agricultural Experimental Station, University of Costa Rica . Alajuela, Costa Rica, 2020.

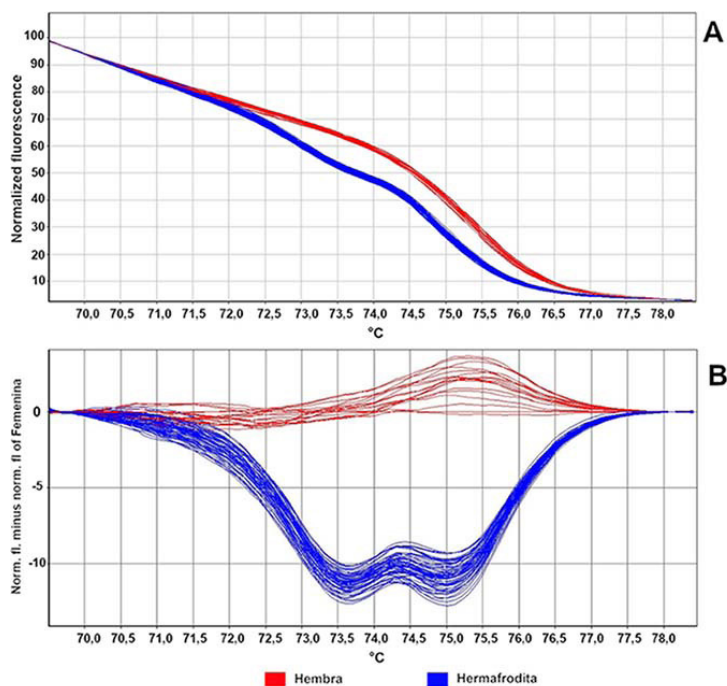


Figura 4. A. Curvas derivadas de fusión normalizada y **B.** Curva de fusión del gráfico de diferencias de temperaturas para plantas hembras y plantas hermafroditas de papaya (*Carica papaya* L.), obtenidos mediante el imprimador SNP CpSERK_HRM_34704, con la técnica HRM. Laboratorio de Biología Molecular, Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

Figure 4. A. Derived normalized melting curves and **B.** Melting curve of the differences graph for female plants and hermaphroditic plants of papaya (*Carica papaya* L.), obtained by the primer SNP CpSERK_HRM_34704, with the HRM technique. Molecular Biology Laboratory, Agricultural Experimental Station, University of Costa Rica . Alajuela, Costa Rica, 2020.

Concordancia entre sexado molecular y tipo de flor en campo

Las plantas que fueron sexadas por medio de PCR-HRM, permanecieron durante tres meses en el invernadero hasta el momento de la floración. La evaluación del tipo de flor real mostró un 100 % de concordancia con la determinada por medio de HRM con marcadores SNP (Figura 5).



Figura 5. A. Desarrollo de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) en invernadero, donde se corroboró el sexado molecular y el sexo real. **B.** flor femenina obtenida en campo, **C.** flor hermafroditas obtenida en campo. Invernadero, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

Figure 5. A. Development of papaya plants (*C. papaya* L.), in a greenhouse, where molecular sexing and real sex were verified. **B.** female flower obtained in the field, **C.** hermaphroditic flower obtained in the field. Greenhouse, Fabio Baudrit Moreno Agricultural Experiment Station, University of Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

Discusión

La precisión de la técnica PCR-HRM en este ensayo fue del 100 %. El marcador tipo SNP escogido durante la primera fase de la investigación, tuvo una concordancia perfecta en el sexado de las plantas de papaya en el laboratorio con respecto a la floración en el campo. Bajo este mismo procedimiento Salaau et al. (2009), encontraron una concordancia del 98 % de plantas hermafroditas y el 2 % en femeninas, y Urasaki et al. (2002) observaron un 97,45 % de plantas hermafroditas y 2,55 % femeninas. Estos porcentajes de fallos, aunque pequeños, representan en extensiones grandes de cultivo pérdidas considerables de fruta hermafrodita que se deja de cosechar y vender para mercado nacional o de exportación.

La identificación del sexo de las plantas de papaya en etapas tempranas, como en la presente investigación, es de suma importancia en explotaciones agrícolas comerciales, donde el fruto producido por la planta con flores hermafroditas es preferido por el productor y el consumidor (Chaves-Bedoya et al., 2009; Liu et al., 2015). Esta preferencia se debe al sabor y la forma alargada de la fruta que favorece el manejo post cosecha y rendimiento al tener menor cavidad seminal. Igualmente, un sexado de precisión de plantas de papaya como el obtenido con PCR-HRM en este estudio, también es trascendental en los programas de mejora, ya que optimiza la producción de semilla híbrida, al identificar los parentales a la edad de almácigo. Los progenitores debidamente sexados son plantados de forma individual en los sitios donde se realizarán las polinizaciones controladas y, posteriormente, se dará la producción de semilla, sea esta para continuar el programa de mejora o semilla de híbridos comerciales para la venta a productores.

El sexado de plantas de papaya con la técnica PCR-HRM seleccionada para el ensayo, es un procedimiento rápido y muy preciso (Kafkas et al., 2015; Simko, 2016), al ser un proceso continuo que en un solo análisis el termociclador puede genotipar las plantas sin necesidad de hacer la electroforesis ahorrando tiempo y recursos. La precisión radica en que es un método muy sensible capaz de detectar el cambio de una sola base nitrogenada en la secuencia de ADN generada por el PCR (amplicón), tiene la ventaja, sobre otros métodos de sexado molecular, de que requiere poco ADN y no de alta calidad (Fitzcharles, 2012). Dentro de las desventajas que tiene esta metodología es el alto costo de los insumos y consumibles que se usan en el análisis, lo cual ha limitado el uso generalizado en el sexado de papaya.

En el campo, los agricultores hacen la identificación del sexo de las plantas visualmente, esto tiene varios inconvenientes, entre ellos están el tiempo que hay que esperar para que el árbol produzca la floración, lo que ocurre entre dos y tres meses posteriores al trasplante, además, esta labor debe realizarla personal entrenado que conozca las diferencias morfológicas entre flores hembra y hermafroditas en sus primeros estadios de desarrollo, estos inconvenientes implican gastos extras en recursos que se pueden evitar con el cultivo de solo plantas hermafroditas (Chaves-Bedoya & Nuñez, 2007). Por otra parte, el tener que sembrar de tres o cuatro plantas por punto de siembra, significa que quedará un 12,5 % y 6,3 % de plantas hembra en el campo respectivamente, haciendo a los productores incurrir en costos de producción más elevados y menores rendimientos por unidad de área (Barrantes et al., 2019).

Conclusión

Mediante la técnica molecular PCR-HRM fue posible identificar con un 100 % de precisión las plantas hembra y hermafroditas a nivel de almácigo, con marcadores tipo SNP, tanto en el híbrido comercial Pococí, como en sus parentales.

Este análisis resulta ser rápido, sencillo y muy práctico, siempre y cuando se cuente con el equipo y reactivos necesarios. Además, la identificación del sexo de cada planta analizada en el laboratorio fue idéntico al sexo real de estas mismas plantas sembradas en el invernadero.

A futuro se debe establecer si el escalamiento comercial de este método es rentable para el agricultor, con base en los costos de su implementación en relación con otros métodos, ya sean estos moleculares o empíricos, usados por los agricultores.

Referencias

- Anandan, R., Thirugnanakumar, S., Sudhakar, D., & Balasubramanian, P. (2011). *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of (*Carica papaya* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 7(5), 1339–1348.
- Araya, E., Bogantes, A., Holst, A., Vargas, C., Gómez L., Brenes, A., Sánchez E., Chavarría, M., & Barboza, L. (2019). Field performance of hermaphrodite papaya plants obtained through molecular selection and micropropagation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 19(4), 420–427. <https://doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4a59>
- Barrantes, W., Loría, C., & Gómez, L. (2019). Evaluación de dos sistemas de sexado en plantas de papaya (*Carica papaya*) híbrido Pococí. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 437–446. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34916>
- Bekheet, S. A., Solliman, M. E., & Taha, H. S. (2007). *In vitro* differentiation of zygotic lines of date palm: Biochemical and molecular approaches to sex determination. *Acta Horticulturae*, 736, 117–126. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.736.10>

- Bhargava, A., & Srivastava, S. (2019). Plant breeding. In A. Bhaegava, & S. Srivastava (Eds.), *Participatory plant breeding: Concept and applications* (1st Ed., pp. 29–68). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7119-6_2
- Bogantes, A., Mora, E., Umaña, G., & Loría, C. (2011). *Guía para la producción de la papaya en Costa Rica*. Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Chaves-Bedoya, G., & Nuñez, V. (2007). A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica*, *153*(1), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9256-7>
- Chaves-Bedoya, G., Pulido, M., Sánchez-Betancourt, E., & Nuñez, V. (2009). RAPD markers for sex identification in papaya (*Carica papaya* L.) in Colombia. *Agronomía Colombiana*, *27*(2), 145–149.
- Chen, J. R., Urasaki, N., Matsumura, H., Chen, I. C., Lee, M. J., Chang, H. J., Chung, W. C., & Ku, H. M. (2019). Dissecting the all-hermaphrodite phenomenon of a rare X chromosome mutant in papaya (*Carica papaya* L.). *Molecular Breeding*, *39*, article 14. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0918-7>
- Da Silva, J. A. T., Rashid, Z., Nhut, D. T. Sivakumar, D., Gera, A., Souza Jr, M. T., & Tennant, P. F. (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, *1*(1), 47–73.
- 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.). *Theoretical and Applied Genetics*, *106*, 107–111. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0995-0>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*, 13–15.
- Fitzcharles, E. M. (2012). Rapid discrimination between four Antarctic fish species, genus *Macrourus*, using HRM analysis. *Fisheries Research*, *127*, 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.02.002>
- Google. (s.f.). *Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno*. Recuperado el 28 de diciembre del 2021 de <https://google.com/maps/Cyi3stkrEbRmcLou7>
- Han, Y., Khu, D. M., & Monteros, M. J. (2012). High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding*, *29*(2), 489–501. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9566-x>
- Kafkas, S., Khodaeiaminjan, M., Güney M., & Kafkas, E. (2015). Identification of sex-linked SNP markers using RAD sequencing suggests ZW/ZZ sex determination in *Pistacia vera* L. *BMC Genomics*, *16*, article 98. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1326-6>
- Lee, C. Y., Lin, H. J., Viswanath, K. K., Lin, C. P., Chang, B. C. H., Chiu, P. H., Chiu, C. T., Wang, R. H., Chin, S. W., & Chen, F. C. (2018). The development of functional mapping by three sex-related loci on the third whorl of different sex types of *Carica papaya* L. *PLoS ONE*, *13*(3), Article e0194605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194605>
- Liu, K., Yuan, C., Li, H., Lin, W., Yang, Y., Shen, C., & Zheng, X. (2015). Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in papaya (*Carica papaya* L.). *BMC genomics*, *16*, Article 901. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2182-0>
- Ming, R., Feng, Y., Yu, Q., Dionne, L. A., Saw, J. H., Senin, P., Salzberg, S. L., Wang, B. V., Lewis, K. L. T., Feng, L., Jones M. R., & Skelton R. L. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, *452*, 991–996. <https://doi.org/10.1038/nature06856>
- Mora, E., & Bogantes, A. (2005). Estudio de una mutación en papaya (*Carica papaya* L.) que produce letalidad de plantas femeninas. *Agronomía Mesoamericana*, *16*(1), 89–94. <https://doi.org/10.15517/am.v16i1.5185>

- Saalau, E., Barrantes, W., Loría, C., Brenes, A., & Gómez, L. (2009). Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido "Pococi". *Agronomía Mesoamericana*, 20(2), 311–317. <https://doi.org/10.15517/am.v20i2.4947>
- Simko, I. (2016). High-resolution DNA melting analysis in plant research. *Trends in Plant Science*, 21(6), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>
- 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*, 104(2), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s001220100693>
- Urasaki, N., Tarora, K., Shudo, A., 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*, 7(7), Article e40904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040904>