

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, GENÓMICA E HISTOLÓGICA DE UNA  
MUTACIÓN SEXUAL EN *Carica papaya* (CARICACEAE)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar por el grado y título de Maestría  
Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología

MIGUEL FRANCISCO BENAVIDES ACEVEDO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

## **DEDICATORIA**

Le dedico este trabajo a mi mamá Yamileth Acevedo Fuentes y a mi papá Jorge Antonio Guzman Saborío que me han dado siempre luz verde para cumplir mis sueños. Y a mi pareja Víctor Muñoz Mata por su apoyo incondicional.

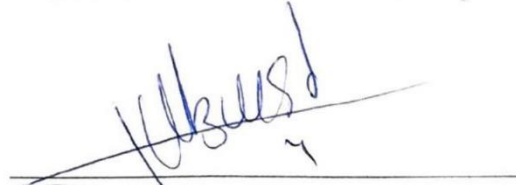
Esa experiencia de contemplación de lo infinito al observar el macrouniverso de un cielo estrellado es similar a la fascinación al estudiar el microuniverso de un ser. Justamente la comprensión paulatina de este microuniverso es a lo que nos permite acceder la histología y la genética plasmada en este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación formó parte del proyecto 734-B6-269 “Mapeo de loci que controlan caracteres cuantitativos en *Carica papaya*” inscrito a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Además, se financió con el Fondo de Apoyo a Proyectos Finales de Graduación de Posgrado brindado por la Vicerrectoría de Investigación y el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica, por el Fondo de Becas CeNAT – CONARE y por fondos del Proyecto Mejoramiento genético de papaya (*Carica papaya*) B6501 a quienes se les agradece por abrirle oportunidades a estudiantes de financiar sus proyectos de investigación. Un gran agradecimiento al Sistema de Becas de la Universidad de Costa Rica por la gran ayuda que les brinda a los estudiantes y que nos permite tener la oportunidad de financiar nuestros estudios superiores.

Se le agradece al M.Sc. Antonio Bogantes y a la señora Gabriela Palma por su gran apoyo en la logística de siembra de los experimentos y en su cuidado agronómico y al M.Sc. Eric Mora por su invaluable ayuda durante el planeamiento de los experimentos y la interpretación de sus resultados. Además, un agradecimiento al LANOTEC, al B.Sc. Reinaldo Pereira y el Ph.D. José Vega por su ayuda con el trabajo en microscopía electrónica y al CIGRAS por permitir realizar los análisis de biología molecular e histología en sus instalaciones. Finalmente, un agradecimiento muy cordial al Ph.D. Karl Broman que ayudó en la resolución de dudas y problemas a la hora de desarrollar el código de análisis de QTLs en R y al Ph.D. Luis Barboza por su guía, ayuda y consejo a lo largo de este trabajo.

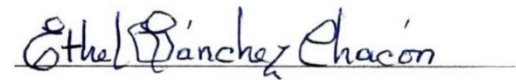
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología”



Dr. Walter Barrantes Santamaría  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**



Dr. Luis Barboza Barquero  
**Director de Tesis**



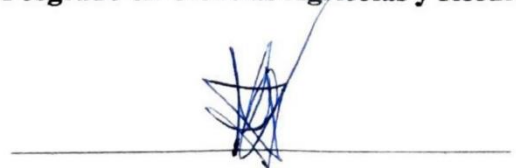
M.Sc. Ethel Sánchez Chacón  
**Asesora de tesis**



M.Sc. Eric Mora Newcomer  
**Asesor de tesis**



Dra. Catalina Salas Durán  
**Directora de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**



Miguel Francisco Benavides Acevedo  
**Candidato**

## TABLA DE CONTENIDO

### Contenidos:

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
HOJA DE APROBACIÓN .....	iv
TABLA DE CONTENIDO .....	v
RESUMEN .....	viii
SUMMARY .....	ix
TABLA DE FIGURAS .....	x
TABLA DE CUADROS .....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	2
2.1 Generalidades de <i>Carica papaya</i> .....	2
2.2 Desarrollo floral en angiospermas.....	5
2.3 Caracterización histológica de las flores de papaya .....	5
2.3.1 Flores perfectas .....	5
2.3.2 Flores pistiladas .....	6
2.3.3 Determinación sexual en angiospermas.....	7
2.3.4 Mecanismos genéticos de desarrollo sexual en papaya .....	9
2.3.5 Genes implicados en el desarrollo de la floración en <i>Arabidopsis</i> de relevancia para el estudio de la mutación en <i>C. papaya</i> .....	9
2.3.6 tGBS y análisis de QTLs para el mapeo genético de mutaciones.....	11
3. JUSTIFICACIÓN .....	12
4. OBJETIVOS .....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos .....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Trabajos en campo.....	15
5.2 Sitio de estudio .....	15
5.3 Definición de los procedimientos .....	15
4.3.1 Análisis anatómico de flores .....	15
4.3.2 Segregación de la mutación .....	17

4.3.3	Identificación de la regulación genética de caracteres de relevancia agronómica.....	17
4.3.4	Uso de marcadores moleculares .....	17
4.3.4.1	Extracción de ADN.....	17
4.3.4.2	Determinación molecular del sexo .....	18
4.3.4.3	Identificación de marcadores moleculares por medio de tGBS .....	18
4.3.4.4	Caracterización molecular de la mutación por medio de HRM .....	19
4.3.4.5	Búsqueda de genes candidatos responsables del fenotipo mutado .....	20
4.4	Análisis de datos.....	20
5	RESULTADOS.....	21
5.1	Análisis anatómicos de flores .....	21
5.1.1	Flores pistiladas .....	21
5.1.2	Flores perfectas.....	22
5.1.3	Flores estaminadas .....	25
5.1.4	Flores hermafroditas mutadas .....	25
5.1.5	Flores hermafroditas pentándricas de plantas de fenotipo silvestre .....	29
5.1.6	Flores hermafroditas pentándricas de plantas mutadas.....	32
5.1.7	Otras flores intermedias de plantas hermafroditas mutadas.....	34
5.2	Segregación de la mutación.....	43
5.3	Uso de marcadores moleculares .....	46
5.3.1	Determinación molecular del sexo .....	46
5.3.2	Caracterización molecular de la mutación de regresión sexual .....	46
5.3.2.1	Identificación de marcadores moleculares por medio de tGBS .....	46
5.3.2.2	Identificación molecular de la mutación por medio de HRM .....	56
5.3.3	Búsqueda de genes candidatos responsables del fenotipo mutado .....	58
6	DISCUSIÓN.....	59
6.1	Análisis anatómicos de flores .....	59
6.2	Segregación de la mutación.....	60
6.3	Uso de marcadores moleculares .....	62
6.3.1	Determinación molecular del sexo .....	62
6.3.2	Caracterización molecular de la mutación de regresión sexual .....	62
6.3.2.1	Identificación de marcadores moleculares por medio de tGBS .....	62
6.3.2.2	Identificación molecular de la mutación por medio de HRM .....	64

	<b>6.3.2.3 Búsqueda de genes candidatos responsables del fenotipo mutado .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>72</b>

## RESUMEN

La papaya es una planta frutal de gran importancia económica como cultivo agrícola. Se considera un modelo para el estudio de la determinación sexual debido a que puede tener hembras, hermafroditas y machos. Las flores de papaya pueden sufrir de carpelodia. Se encontró una mutación en una planta hermafrodita que produce una mezcla de flores perfectas, femeninas e intermedias, cuyo fenotipo se heredó a lo largo de cuatro generaciones por medio de cruces y retrocruces. El objetivo de la investigación fue caracterizar aspectos genéticos, genómicos e histológicos de la mutación que revierte el sexo, de hermafrodita a femenino, en *Carica papaya*. Se encontró que macroscópicamente y microscópicamente las flores femeninas provenientes de plantas hermafroditas mutadas son iguales a las flores femeninas provenientes de plantas femeninas silvestres. El fenotipo mutado no segrega de forma mendeliana. Es posible que el fenotipo mutado sea causado por un cambio epigenético transgeneracional. Por medio del análisis de la secuenciación por tGBS se encontró un QTL en el cromosoma dos de la papaya que está correlacionado con el fenotipo mutado, este se ubica entre los 35.85 cM y los 42.81 cM. Además, se encontraron nueve marcadores moleculares correlacionados de forma significativa con el fenotipo mutado que permitieron realizar la diferenciación molecular de plantas mutantes y no mutantes. Se encontró que es posible el cambio fenotípico de una planta hermafrodita en una planta femenina, por lo que, es posible que el ancestro original de la papaya haya sido un organismo monoico. Es posible que los genes *AGL8-related*, el *transportador GABA 1* y el *NAD dependiente de epimerasa/dehidratasa* se encuentren relacionados con la generación del fenotipo mutante ya que se encuentran dentro de la región del QTL encontrado. El estudio del transcriptoma y metiloma de esta mutación puede ayudar a identificar o comprobar de forma específica el o los genes que causan este fenotipo y, si estos están relacionados con la carpelodia, pueden ayudar al mejoramiento genético de líneas con carpelodia disminuida o nula.



## SUMMARY

Papaya is a fruit plant of economic importance as a crop. It is a model for sex determination studies because it can have female, hermaphrodite, and male individuals. Papaya's flower can suffer carpellody. A sexual regression mutation was found in a hermaphrodite papaya's plant that has perfect, female, and intermediate flowers, whose phenotype was inherited over four generations through crosses and backcrosses. The goal of this research was to characterize genetic, genomic, and histologic aspects of the mutation that revert the sex from hermaphrodite to female in *Carica papaya*. Macroscopically and microscopically female flowers, from mutant hermaphrodite plants, were equal than female flowers, from wild type female plants. The mutation did not segregate in a Mendelian manner. It is possible that the mutated phenotype was caused by a transgenerational epigenetic change. Based on tGBS sequencing it was found a QTL at the second chromosome of papaya that is positive correlated to the mutated phenotype. This QTL was found between 35.85 cM and 42.81 cM of the second chromosome. At this chromosome were also found nine molecular markers related with the mutated phenotype, they were used to molecularly differentiate mutated and wild type plants. It is possible the transformation of a hermaphrodite plant to a female plant, therefore, it is possible that the original ancestor of papaya was a monoicous organism. It is possible that the genes *AGL8-related*, the *GABA transporter 1* and the *epimerase / dehydratase-dependent NAD*, located inside the QTL region, could be related to the generation of the mutant phenotype. Transcriptome and methylome analysis might help to identify the gene or genes that cause the mutated phenotype, if these genes are related with carpellody, they can be used to create papaya varieties with carpellody diminished or absent.

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación del genotipado de acuerdo a los controles parentales (P1 y P2) y F1 de <i>Carica papaya</i> por medio de HRM con el software de Bio-Rad <i>Precision Melt Analysis</i> ..	20
<b>Figura 2.</b> Caracterización tridimensional de una flor pistilada proveniente de una planta femenina de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Morfología microscópica de cortes transversales de flores pistiladas provenientes de plantas de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> teñidos con Azul de Toluidina.....	23
<b>Figura 4.</b> Caracterización tridimensional de una flor estaminada proveniente de una planta hermafrodita de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> . .....	24
<b>Figura 5.</b> Morfología microscópica de cortes transversales de flores estaminadas provenientes de plantas de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> teñidos con Azul de Toluidina.....	27
<b>Figura 6.</b> Caracterización tridimensional de una flor masculina proveniente de una planta masculina de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> . .....	27
<b>Figura 7.</b> Morfología microscópica de cortes transversales de flores masculinas provenientes de plantas de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> teñidos con Azul de Toluidina.....	28
<b>Figura 8.</b> Caracterización tridimensional de una flor femenina proveniente de una planta hermafrodita mutada de <i>Carica papaya</i> . .....	29
<b>Figura 9.</b> Morfología microscópica de cortes transversales de flores con morfología pistilada provenientes de plantas hermafroditas mutadas de <i>Carica papaya</i> teñidos con Azul de Toluidina.....	30
<b>Figura 10.</b> Caracterización tridimensional de una flor pentábrica proveniente de una planta hermafrodita de fenotipo silvestre de <i>Carica papaya</i> . .....	33
<b>Figura 11.</b> Microfotografía de cortes transversales de flores pentábricas provenientes de plantas de <i>Carica papaya</i> hermafroditas no mutadas.....	33
<b>Figura 12.</b> Caracterización tridimensional de una flor pentábrica proveniente de una planta hermafrodita mutada de <i>Carica papaya</i> . .....	34
<b>Figura 13.</b> Microfotografías de cortes transversales de flores de <i>Carica papaya</i> pentábricas provenientes de plantas hermafroditas mutadas. ....	35

<b>Figura 14.</b> Diferentes grados de flores intermedias carpelódicas provenientes de plantas hermafroditas mutadas de <i>Carica papaya</i> . Las flechas verdes señalan las anteras carpelódicas y las flechas azules las anteras no carpelódicas.....	37
<b>Figura 15.</b> Diferentes fenotipos de anteras encontradas en flores intermedias provenientes de plantas hermafroditas mutadas de <i>Carica papaya</i> . Las flechas verdes señalan las anteras carpelódicas y las flechas azules las anteras no carpelódicas.....	39
<b>Figura 16.</b> Microfotografías de cortes transversales de flores de diferentes grados de carpelodia provenientes de plantas hermafroditas de <i>Carica papaya</i> mutadas.....	41
<b>Figura 17.</b> Cruces y retrocruces realizados para analizar el patrón de segregación de la mutación de regresión sexual en <i>Carica papaya</i> .....	43
<b>Figura 18.</b> Curva de fusión de ADN de los controles hermafrodita (verde), femenino (gris) y blanco (negro) de <i>Carica papaya</i> . ....	47
<b>Figura 19.</b> Análisis de QTLs por medio de marcadores derivados de la secuenciación por tGBS realizada a plantas mutadas y no mutadas de <i>Carica papaya</i> . ....	48
<b>Figura 20.</b> Valor LOD con respecto a la fracción de recombinación de los marcadores moleculares obtenidos por tGBS en individuos mutantes y no mutantes del cromosoma 2 de <i>Carica papaya</i> . ....	49
<b>Figura 21.</b> Análisis de QTLs del cromosoma 2 de la secuenciación por GBS realizada a plantas mutadas y no mutadas de <i>Carica papaya</i> .....	50
<b>Figura 22.</b> Genotipos de plantas mutadas y control en <i>Carica papaya</i> .....	51
<b>Figura 23.</b> Mapa de ligamiento del cromosoma 2 de <i>Carica papaya</i> .....	53
<b>Figura 24.</b> Representación de la comparación de las fracciones de recombinación (RF) y del valor LOD para estimar el ligamiento de los marcadores moleculares obtenidos para el análisis de QTL.....	55
<b>Figura 25.</b> Pico de fusión del ADN por medio de qPCR (columna de la izquierda), curva de diferenciación del punto de fusión del ADN .....	57

## TABLA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Patrón de segregación de la mutación de regresión sexual de cruces y retrocruces de <i>Carica papaya</i> evaluadas fenotípicamente en el campo con sus respectivos genotipos hipotéticos.....	45
<b>Cuadro 2.</b> Sexado molecular en cinco poblaciones distintas de <i>Carica papaya</i> por medio de qPCR.....	48
<b>Cuadro 3.</b> Resumen de los marcadores moleculares más significativos para una mutación de regresión sexual en <i>Carica papaya</i> . .....	52
<b>Cuadro 4.</b> Porcentajes de aciertos del fenotipo a partir del genotipo obtenido por HRM de una población de 294 plantas de <i>Carica papaya</i> obtenidas por un cruce cerrado de plantas hermanas mutantes .....	56
<b>Cuadro 5.</b> Información general del diseño de los marcadores moleculares para la identificación del fenotipo mutado de <i>Carica papaya</i> . .....	58



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Miguel Francisco Benavides Acevedo, con cédula de identidad 1-1457-0133, en mi condición de autor del TFG titulado CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, GENÓMICA E HISTOLÓGICA DE UNA MUTACIÓN SEXUAL EN Carica papaya (CARICACEAE)

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## 1. INTRODUCCIÓN

La especie *Carica papaya* L. es una planta frutal de gran importancia económica como cultivo. Es considerada una planta tropical modelo para el estudio de la determinación sexual, debido a que puede tener tres formas sexuales: hembras, hermafroditas y machos. Las plantas de papaya hermafroditas pueden presentar diferentes grados de fusión entre sus estambres y el ovario, lo cual es conocido como carpelodia. Cuando cinco estambres antepétalos se encuentran completamente transformados en carpelos, las flores y frutos algunas veces se asemejan a flores y frutos femeninos (Jiménez et al., 2014), pero normalmente los diferentes grados de carpelodia producen morfologías aberrantes (Ronse, L.P.; Smets, 1999; Ronse De Craene et al., 2011), produciéndose flores de tipo pentandria en una frecuencia muy baja (Ronse De Craene et al., 2011).

La regresión sexual puede permitir entender mejor el origen sexual evolutivo de la bisexualidad en flores angiospermas (Frohlich & Parker, 2000; Ronse De Craene et al., 2011). No existe un consenso aceptado sobre el origen evolutivo de la bisexualidad. Hay algunos autores que teorizan que las flores unisexuales de papaya son derivadas de un ancestro bisexual basados en el desarrollo microscópico de las estructuras florales (Storey, 1969), pero hay otros autores que argumentan en contra de esta teoría (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

Recientemente se identificó una nueva mutación en una planta hermafrodita de papaya que produce una mezcla de flores perfectas, femeninas e intermedias (datos sin publicar). Esta mutación se hereda a la progenie de la planta mutante original, y produce una amplia gama de fenotipos intermedios. Sin embargo, en las poblaciones que segregan esta mutación, el fenotipo cambia de producir flores hermafroditas a producir flores de aspecto femenino. Por lo que el objetivo de esta investigación es caracterizar aspectos genéticos, genómicos e histológicos de la mutación que revierte el sexo, de hermafrodita a femenino, en *Carica papaya* (Caricaceae). Los resultados además de caracterizar esta nueva mutación pueden ayudar a esclarecer el panorama de la evolución de la bisexualidad en la papaya y en los angiospermas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de *Carica papaya*

La familia Caricaceae es una familia pequeña de plantas compuesta por los géneros *Cylicomorpha*, *Jarilla*, *Jacaratia*, *Vasconcellea*, *Horovitzia* y *Carica*, y 31 diferentes especies en estos géneros (Antunes Carvalho & Renner, 2012; Badillo, 1971). *Carica papaya* L. es un árbol frutal importante que se ha estudiado ampliamente por su importancia económica como cultivo (Aryal & Ming, 2014; Chan-Tai et al., 2003; Jiménez et al., 2014; Ming et al., 2007, 2008; Niklas & Marler, 2007; Paz & Vázquez-Yanes, 1998; Zhang et al., 2014; Zou et al., 2016). La papaya es el tercer cultivo tropical más sembrado a nivel mundial y es de importancia nutricional ya que el fruto tiene altos niveles de vitaminas, minerales, aminoácidos y fibras, y sus tallos, hojas y raíces se usan en diferentes aplicaciones medicinales e industriales como en la extracción de papaína (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017).

La papaya es considerada como una planta tropical modelo para el estudio de la determinación sexual debido a que puede tener tres formas sexuales: hembras, hermafroditas y machos. Las plantas hermafroditas y femeninas producen pequeñas inflorescencias, con pequeñas flores que pueden variar de entre dos a quince flores por eje floral. Por el contrario, las plantas machos tienen panículas largas que pueden tener cientos de flores (Jiménez et al., 2014). Además, al estar dentro del clado Brassicales, evolucionó del mismo antepasado que *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), por lo que tienen muchas características genéticas en común (Wang et al., 2012). Al ser *Arabidopsis* una especie modelo del reino Plantae, debido a que se encuentra ampliamente estudiada y caracterizada a nivel fenotípico y genotípico, puede emplearse para la búsqueda de genes homólogos en especies filogenéticamente cercanas como la papaya (Barker et al., 2009; Carvalho & Renner, 2014; Lyons et al., 2008; Takata et al., 2009).

La papaya es una especie diploide, trioica con individuos femeninos, masculinos y hermafroditas andromonoicos, estos últimos presentes únicamente en plantaciones agrícolas. En condición natural se encuentran únicamente individuos dioicos, individuos femeninos y masculinos. Su genoma tiene un tamaño de 372 Mb el cual se encuentra secuenciado pero no ensamblado, con anotaciones que se encuentran en desarrollo; posee nueve pares de cromosomas haploides ( $2n = 18$ ), con un sistema de cromosomas sexuales primitivo

(Arumuganathan & Earle, 1991; Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017; Li et al., 2013; Liu et al., 2004; Ming et al., 2008; Zeng et al., 2014). El genoma de la papaya es tres veces el tamaño del genoma de *Arabidopsis* (125 Mb), pero posee un número de genes menor que *Arabidopsis* ( $2n=10$ ), en la cual se calcula que tiene 25.498 genes (Eguiarte et al., 2003; Ming et al., 2008).

El sexo en papaya está determinado por un solo gen, llamado *Sex1*, con tres alelos; las plantas femeninas son homocigotas recesivas (mm), las masculinas son heterocigotas (Mm) al igual que las hermafroditas ( $M^hm$ ) (Liu et al., 2004). Los genotipos MM,  $M^hM^h$ ,  $MM^h$  son incompatibles con la vida, y mueren en una etapa embrionaria, por lo que el 25% de las semillas producidas no son viables (Karunakaran et al., 2010; Liu et al., 2004). El cromosoma Y de la papaya se encuentra bien caracterizado, en el cual alrededor del 10 % del cromosoma a lo largo de la evolución de la papaya ha sufrido supresión por recombinación y degeneración de su secuencia (VanBuren et al., 2015). Sin embargo, en la región específica para los machos (MSY) se comparte un gran porcentaje de su secuencia entre plantas hermafroditas y machos, y se sugiere que el sexo hermafrodita surge por la domesticación humana (Liu et al., 2004; VanBuren et al., 2015).

Genes específicos de la papaya se han caracterizado por medio de diferentes tipos de análisis genéticos. Por ejemplo, se empleó la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para caracterizar *Sex1*, que es un gen que determina el sexo de las flores (Deputy et al., 2002), para realizar mapas de ligamiento genético a lo largo del genoma de la papaya (Sondur et al., 1996), y para encontrar marcadores para la diferenciación molecular del sexo de la papaya por medio de secuencia caracterizada región amplificada (SCAR) (Chaves-Bedoya & Nuñez, 2007). Los estudio de asociación del genoma completo se han usado para estudiar genes que codifican para dominios de unión a nucleótidos (NBS) (Porter et al., 2009). También los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se han empleado para desarrollar marcadores moleculares en papaya para estudiar la diversidad genética de diferentes variedades comerciales de papaya (Kim et al., 2002). Así mismo se ha empleado análisis del transcriptoma de la papaya para el mapeo de genes relacionados con el sexo (Lee et al., 2018).

Las plantas de papaya hermafroditas son andromonoicas y normalmente tienen flores femeninas estériles (estaminadas) que rodean a una flor perfecta, la cantidad depende del



genotipo y las flores se producen en una inflorescencia de tipo cima (Fisher, 1980; Jiménez et al., 2014). El grado de esterilidad femenina depende de factores genéticos y ambientales (Jiménez et al., 2014). Diferentes tipos de estrés, como altas temperaturas o escasez de nitrógeno o agua, pueden incrementar la esterilidad, llevando en muchos casos, a la formación de flores completamente estaminadas y estériles (Jiménez et al., 2014).

Las plantas de papaya hermafroditas pueden presentar diferentes grados de carpelodia, que es la fusión entre sus estambres y el ovario. Cuando cinco estambres antepétalos se encuentran completamente transformados en carpelos, las flores y frutos algunas veces se asemejan a flores y frutos femeninos (Jiménez et al., 2014). Sin embargo, normalmente los diferentes grados de carpelodia producen morfologías aberrantes (Ronse, L.P.; Smets, 1999; Ronse De Craene et al., 2011). Se ha reportado solo unos pocos casos de plantas hermafroditas con carpelodia que producen flores de tipo pentandria, con una fusión equitativa de estambres antepétalos con el ovario, produciendo carpelos abultados semejantes a frutos femeninos en una frecuencia muy baja (Ronse De Craene et al., 2011). La ocurrencia de flores carpelódicas se han relacionado con componentes genéticos, bajas temperaturas (Mora Bogantes &, 2017), alto nivel de humedad en el sustrato y altos niveles de nitrógeno (Jiménez et al., 2014).

La carpelodia se ha propuesto como un fenómeno que puede intervenir en la evolución sexual en especies como *C. papaya* y *A. thaliana*. Sin embargo, la caracterización genética de los genes que intervienen en los procesos de carpelodia aún son desconocidos (Ronse De Craene et al., 2011). Por lo que, el estudio de la genética de la carpelodia puede ayudar a dilucidar cómo fue que se llevó a cabo la evolución sexual de la papaya y de otras angiospermas.

Para la producción comercial de papaya, el sexo preferido es el hermafrodita, debido al tamaño y forma del fruto. Cuando se autopolinizan plantas hermafroditas el patrón de segregación es 2:1 (plantas hermafroditas:femeninas), al cruzar una planta hermafrodita con una femenina, la segregación es 1:1 (plantas hermafroditas:femeninas) (Khan et al., 2002). Esto genera un problema, debido a que el sexo típicamente se puede determinar hasta que la planta alcance la madurez sexual. Para solventar este inconveniente se han desarrollado marcadores genéticos que permiten realizar el sexado de los individuos a nivel de plántula, y así ahorrar recursos, tiempo y espacio (Deputy et al., 2002; Ming et al., 2007; Urasaki et al., 2002). Dentro de los marcadores más recientes desarrollados se encuentra el uso de HRM

(Lee et al., 2018). También se han desarrollado técnicas no basadas en PCR como lo son la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH)” (Abreu et al., 2015) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Hsu et al., 2012).

## **2.2 Desarrollo floral en angiospermas**

Las flores poseen normalmente cuatro órganos florales que se acomodan espacialmente en forma de espiral, los sépalos, pétalos, estambres y carpelos, de adentro hacia afuera, respectivamente (Coen & Mayerowitz, 1991; Irish, 2010; Meyerowitz et al., 1989; Schwarz-Sommer et al., 1990). Sin embargo, hay flores mutantes en *A. thaliana* y en *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae) en las que las identidades de estos órganos cambian de posición dependiendo de la expresión de una combinación tetrámera de genes. Hay cinco clases de genes florales homeóticos que determinan la identidad de los órganos florales, la clase A incluye a los genes *AP1* y *AP2*, la clase B incluye a los genes *AP3* y *PI*, la clase C incluye a *AG*, la clase D incluye a los genes *stk*, *shp1* y *shp2*, y la clase E incluye a los genes *SEP3*, *SEP2* y *SEP3* (Coen & Mayerowitz, 1991; Honma & Goto, 2000; Schwarz-Sommer et al., 1990). La identidad de los pétalos está determinada por la unión de las clases A + B + E, la de los estambres por B + C + E, los carpelos por C+ E y los sépalos únicamente por A (Theißen et al., 2016; Theißen & Saedler, 2001).

## **2.3 Caracterización histológica de las flores de papaya**

La descripción microanatómica de las flores hermafroditas, machos, femeninas, y con diferentes grados de carpelodia, ha sido una herramienta esencial para poder comprender las diferencias en la formación de las diferentes estructuras florales a lo largo de su desarrollo (Ronse, L.P.; Smets, 1999; Ronse De Craene et al., 2011; Storey, 1969).

### **2.3.1 Flores perfectas**

Según la caracterización macro y micro anatómica del desarrollo de flores de papaya realizada por Ronse y Smets (1999), en la base presentan un anillo de cinco haces vasculares que pertenecen a los haces fusionados de los pétalos y sépalos de la flor. Conforme se desplaza hacia el ápice de la flor, los haces sufren una separación, los cinco haces, de los sépalos se mueven hacia la periferia, y se dividen formando dos o tres nuevos haces cada uno

de ellos, separándose de los pétalos y formando un anillo externo que forma el cáliz. En este punto, en el tejido vascular central, se encuentran los rastros de 10 estambres alternados con los haces de los pétalos (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

Al continuar el desplazamiento hacia el ápice de la flor, se observa en el centro el pistilo, y se comienza a percibir la separación entre los pétalos y el pistilo. Los haces vasculares de los pétalos se agrandan y separan estructuralmente en pétalos individuales. En este punto los sépalos comienzan a disminuir en tamaño hasta desaparecer. De forma similar, el pistilo en cierto punto termina. El tubo de los estambres, que se encontraba fusionado con los pétalos en la base de la flor, se separa de los pétalos, y surgen las anteras de los estambres de los antepétalos. Los filamentos de las anteras de los antepétalos son más pequeños que los de los antesépalos y conforme se acerca al ápice de la flor, únicamente las anteras de los antesépalos se pueden observar (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

### **2.3.2 Flores pistiladas**

Como sucede en las flores perfectas, primeramente, se da la divergencia entre los haces vasculares de los sépalos y pétalos, formando los pétalos y sépalos propiamente dichos. Los haces vasculares de los sépalos se dividen varias veces y se extienden hacia la periferia formando un anillo externo que da origen al cáliz. A este nivel, cinco rastros divergen de la estructura central en alternancia con los haces de los pétalos. De igual forma, los haces de los pétalos se dividen en diferentes haces, y los pétalos comienzan a separarse estructuralmente, formando pétalos individuales. A su vez del tejido vascular central se originan cinco rastros de haces vasculares opuestos a los pétalos que se desplazan a una posición marginal, y cinco que adquieren una posición dorsal y dan origen a otros pequeños rastros de haces vasculares laterales (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

En este punto se pueden observar los cinco lóculos centrales, los que se diferencian en cinco lóbulos con invaginaciones de papilas placentarias. Los rastros de haces vasculares más internos se dividen y conectan a los óvulos que se encuentran en el lóbulo placentario. Los óvulos son alimentados por medio de los haces vasculares derivados de los haces dorsales y ventrales (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

### 2.3.3 Determinación sexual en angiospermas

Las plantas hermafroditas, que poseen órganos femeninos y masculinos en la misma flor, son las más abundantes en la naturaleza, con aproximadamente un 90 % del total de plantas con flor; seguido de las plantas monoicas, que son plantas con flores masculinas y femeninas en el mismo individuo, con un 5% de las plantas con flor. Las plantas dioicas, que son individuos que poseen flores masculinas y femeninas en diferentes plantas, con un 5 % de las plantas con flor (Charlesworth, 2002; Renner & Ricklefs, 1995). En angiospermas se considera que la cosexualidad, entendida como una planta que tiene la función sexual masculina y femenina, ya sea hermafrodita o monoica, se considera como un estado ancestral, debido a la baja frecuencia y distribución dispersa a nivel taxonómico de los cromosomas sexuales y de las plantas dioicas (Charlesworth, 2002).

En la mayor parte de las angiospermas se considera que las plantas unisexuales derivan de un ancestro hermafrodita (Aryal & Ming, 2014). El genotipo hermafrodita en plantas se ha documentado en múltiples ocasiones con una expresión lábil como, por ejemplo, *Cerasium tomentosum* (Caryophyllaceae), *Silene pendula* (Caryophyllaceae), *Kalanche integra* (Crassulaceae), *Arisaema japolica* Bl. (Araceae), *Myrica gale* L. (Myricaceae), entre otras especies (Ainsworth, 2000; Freeman et al., 1980; Korpelainen, 1998). Se ha propuesto que esta plasticidad puede ser una fuerza que está atrás de la evolución dioica (Delph, 2003).

La regresión sexual ha sido analizada desde un punto de vista evolutivo para entender el origen sexual de la bisexualidad en las flores angiospermas. La teoría del macho predice que las flores angiospermas derivan de un ancestro con estructuras reproductivas masculinas. El macho se transforma en bisexual, y los microesporófilos modificados encierran los óvulos, formando el carpelo de las angiospermas (Frohlich & Parker, 2000; Ronse De Craene et al., 2011).

Las teorías del macho y de la hembra establecen que los ejes de las flores con unidades reproductivas masculinas en la región basal, y que las unidades reproductivas femeninas en la región apical resultan de cambios en la expresión génica (Ronse De Craene et al., 2011; Theißen & Becker, 2004). Sin embargo, algunos autores, basados en el desarrollo microscópico de estructuras sexuales, teorizan que las flores unisexuales de papaya se derivan de un ancestro bisexual (Storey, 1969). También hay otros autores que argumentan

en contra de esta teoría (Ronse, L.P.; Smets, 1999), por lo que se requiere de más evidencia que esclarezca cuál de las hipótesis es la correcta.

Por medio de los cruces entre plantas dioicas con plantas relacionadas monoicas o hermafroditas, se sugiere que existen dos loci en la determinación sexual. La mayor parte de las plantas tienen machos heterocigotos o tienen machos heterogaméticos XY. Los machos deben tener un supresor de la femineidad dominante ( $Su^F$ ), que en autofecundación se espera una proporción de machos con respecto a hembras de 3:1. En el caso de plantas que tengan el cromosoma Y degenerado se produce una descendencia inviable con una proporción machos:hembras de 2:1 (Charlesworth, 2002).

Si se establece como punto inicial la cosexualidad, la evolución a dos sexos separados requiere dos cambios genéticos. Uno de estos es la esterilidad femenina para producir machos, o la esterilidad masculina, para producir hembras. Existen mutaciones parciales de esterilidad que generan cambios graduales y fenotipos intermedios (Charlesworth, 2002). Estos fenotipos intermedios, y generación aleatoria en baja frecuencia han sido reportados en papaya, la cual resulta un modelo para el estudio de la evolución sexual y determinación de sexos en plantas (Ronse, L.P.; Smets, 1999; Ronse De Craene et al., 2011).

Existen reportes en especies dioicas de machos inconsistentes que pueden producir frutos aberrantes. Esto puede indicar que una mutación recesiva dio origen a las hembras en la población, y que una vez que esta se estableció en la población, generó mayor disponibilidad de óvulos, y una mayor demanda de polen, mediada por presión sexual hacia las flores hermafroditas. Por lo anterior, se vieron favorecidas bajo este contexto, las mutaciones que generen esterilidad femenina total o parcial y promuevan la formación de machos más o menos establecidos en la población (Charlesworth, 2002).

La evolución de los cromosomas sexuales está altamente conectada con la degeneración del cromosoma Y. Se han encontrado que los genotipos YY no son compatibles con la vida, mientras que genotipos X haploides sí son viables, sugiriendo que los cromosomas Y de las plantas han ido perdiendo funciones con el tiempo (Charlesworth, 2002).

Producto de un proceso de selección artificial en el cultivo de papaya existen muchas variedades que son hermafroditas. De hecho, las poblaciones de papaya en la naturaleza no tienen individuos hermafroditas, son poblaciones dioicas con plantas femeninas y machos únicamente (Chávez-Pesqueira et al., 2014; Paz & Vázquez-Yanes, 1998).

### 2.3.4 Mecanismos genéticos de desarrollo sexual en papaya

En las últimas dos décadas se han identificado muchos mecanismos moleculares, señales y genes que afectan el desarrollo de los ovarios y óvulos de las plantas. Algunas de estas vías metabólicas están relacionadas con el desarrollo de estreses abióticos, como la muerte celular programada o apoptosis, especies reactivas de oxígeno, genes relacionados a la mitosis (como los inhibidores de kinasa dependiente de ciclina), sistemas de señalamiento derivados del azúcar (como la teahalosa-6 fosfato, la kinasa relacionada con la sacarosa no fermentada (SnRK), blanco de la kinasa rapamicina (TOR)), invertasas, proteínas de choque térmico y la interacción entre el azúcar y las vías metabólicas de los reguladores de crecimiento vegetales (Liu et al., 2015; Lunn et al., 2014). Recientemente, los genes de la expansina y de la pectinasa se han implicado en el aborto de ovarios del maíz sometidos a déficit hídrico (Oury et al., 2016).

Los micro-RNAs han sido propuestos en el desempeño de un papel importante en el desarrollo de las diferencias sexuales en algunas especies vegetales, incluida la papaya, en la que el miR69 se propuso como un posible represor del ovario (Aryal et al. 2014). Además, miRNAs han sido propuestos como efectores posteriores de SnRK1 en respuesta a estrés (Confraria et al. 2013), estableciendo una posible conexión entre el estrés y la esterilidad femenina (Aryal et al., 2014; Confraria, Martinho, Elias, Rubio-Somoza, & Baena-González, 2013).

Recientemente Lee et al., (2018) reportaron la presencia de SNPs dentro de genes *CpSVPL* (*short vegetative phase-like*), el factor 1 de ensamblaje de la cromatina subunidad A (*CpCAF1AL*), y el receptor kinasa de embriogénesis somática (*CpSERK*), asociados con diferentes tipos de sexo. Sin embargo, a pesar de los estudios mencionados, aún se desconocen los genes responsables de controlar la expresión sexual lábil en papaya (Lee et al., 2018).

### 2.3.5 Genes implicados en el desarrollo de la floración en *Arabidopsis* de relevancia para el estudio de la mutación en *C. papaya*

*Arabidopsis* está filogenéticamente relacionada con la papaya. Por ello, se puede aprovechar las similitudes en sus genomas, y la gran información disponible acerca de la genética de *Arabidopsis*, para realizar la búsqueda de genes homólogos putativos que puedan ser los

candidatos que se vieron afectados por la mutación que se pretende estudiar (Barker et al., 2009; Lyons et al., 2008; Takata et al., 2009).

Hay genes que se expresan en las flores, por ejemplo, *APETALA1 (API)* es un gen que se expresa en el meristemo floral que confiere la identidad al meristemo floral, pertenece al *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *FT* se expresa en las hojas en respuesta al fotoperiodo, pero la proteína *FT* actúa en el meristemo, y promueve la expresión de *APETALA1* (Corbesier et al., 2007; Simon et al., 1996). *CAULIFLOWER (CAL)* también es un gen de identidad del meristemo floral (Kempin et al., 1995; Purugganan & Suddith, 1998), al igual que *LEAFY (LFY)* (Simon et al., 1996), y que *LATE MERISTEM IDENTITY 1 (LMII)* (Saddic et al., 2006). *TERMINAL FLOWER (TLF)* se expresa en los meristemos del vástago e interviene en la represión de la expresión de *LFY* y de *API* (Hanzawa et al., 2005; Liljegren et al., 1999; Simon et al., 1996). *SUPERMAN (SUP)* se expresa en el meristemo floral, interviene en el replazo de los carpelos por estructuras quiméricas que fusionan los carpelos con los estambres. Este gen resulta de gran interés en el estudio de la carpelodia, y de la mutación que se pretende estudiar, ya que justamente en la carpelodia se da la transformación y fusión de los filamentos de las anteras, e incluso de las anteras, en carpelos (Ronse De Craene et al., 2011). *TFS1* pertenece a *FLOWERING LOCUS C (FTC)*, se expresa en las etapas tempranas del desarrollo floral, juega un papel como inhibidor en la transición floral y codifica un factor de transcripción de tipo B3 (Richter et al., 2019).

Por otra parte, hay otros genes que se expresan en las hojas. Por ejemplo, *CONSTANS (CO)* se expresa en los tejidos vasculares de las hojas y en las células compañeras del floema, este activa la transcripción de *FT* en el tejido vascular de las hojas (Corbesier et al., 2007; Simon et al., 1996). *KNATI*, codifica para la proteína Homeobox knotted-1-like 1, se expresa en el meristemo apical del vástago y causa la floración en mutantes *CO* (Corbesier et al., 2007). *FRUITFULL (FUL)* se expresa en las hojas, y desencadena la floración por medio de una cascada de reacción cuya señal se transmite al *FLOWERING LOCUS T* (Corbesier et al., 2007; Richter et al., 2019).

Otros genes forman parte de la expresión de los meristemos. Por ejemplo, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CON- STANS 1 (SOC1)* se expresa en el meristemo floral e interviene en la iniciación de la floración (Corbesier et al., 2007). *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 15 (SPL15)* se expresa en el meristemo apical del vástago y

coopera con *SOCI* en la expresión de genes como *FRUITFULL* (Richter et al., 2019). *POUND-FOOLISH* (*PNF*) interviene en el desarrollo del meristemo floral (Depeursinge et al., 2010; Rutjens et al., 2009), al igual que *SEPALLATA3* (*SEP3*) (Kaufmann et al., 2009; Teper-Bamnlker & Samach, 2005).

### **2.3.6 tGBS y análisis de QTLs para el mapeo genético de mutaciones**

El genotipado por secuenciación (GBS por sus siglas en inglés) es una técnica que usa como estrategia de secuenciación de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés) la reducción del genoma de forma representativa por medio del uso de enzimas de restricción (Baird et al., 2008; Ott et al., 2017; Poland et al., 2012). El tGBS es una variante que emplea dos enzimas de restricción para generar segmentos del genoma en orientaciones opuestas que se ligan por complementariedad a oligonucleótidos y se secuencian por HTS (Ott et al., 2017). Esta técnica se ha aplicado a investigaciones para el mejoramiento genético de cultivos debido a su bajo costo. También permite realizar un mapeo genético de mutaciones, polimorfismos y características de interés agronómico (Ott et al., 2017; Wickland et al., 2017) basado en loci de rasgos cuantitativos (QTLs, por sus siglas en inglés) de diferentes especies vegetales incluida *C. papaya* (Arler, 2007; Liang et al., 2021; Moore et al., 2003; Nantawan et al., 2019; Ueno et al., 2015).



### 3. JUSTIFICACIÓN

La expresión del genotipo hermafrodita ha sido documentada en muchas ocasiones en el reino Plantae. La plasticidad de los organismos vegetales se ha propuesto como una posible fuerza detrás de la evolución dioica (Delph, 2003, 2009). Para realizar estudios de expresión sexual lábil, la papaya resulta un excelente modelo debido a su plasticidad reportada en los diferentes sexos (Ronse De Craene et al., 2011).

La regresión sexual analizado desde un punto de vista evolutivo puede permitir entender mejor el origen sexual de la bisexualidad en flores angiospermas. La teoría del macho predice que las flores angiospermas derivaron de las estructuras masculinas de un ancestro, en donde el macho se convierte en bisexual, y el microesporófilo modificado encierra los óvulos, formando el carpelo de los angiospermas (Frohlich & Parker, 2000; Ronse De Craene et al., 2011). Las teorías del surgimiento a partir del macho o de la hembra, establecen que las flores con ejes con unidades reproductivas masculinas en la región basal, y unidades reproductivas femeninas en el ápice, resultan de cambios en la expresión génica (Ronse De Craene et al., 2011; Theißen & Becker, 2004). Existen algunos autores que teorizan que las flores unisexuales de papaya son derivadas de un ancestro bisexual basados en el desarrollo microscópico de las estructuras florales (Storey, 1969), pero hay otros autores que argumentan en contra de esta teoría (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

Recientemente se identificó una nueva mutación en papaya que provoca que una planta hermafrodita de papaya produzca una mezcla de flores perfectas, femeninas e intermedias (datos sin publicar). Esta mutación se hereda a la progenie de la planta mutante original, produciendo la formación de una amplia gama de fenotipos intermedios. Un estudio histológico preliminar de las flores femeninas de las plantas mutadas no muestra la presencia de anteras. Los resultados obtenidos del estudio a profundidad de los cambios microanatómicos y genéticos que causan esta mutación puede esclarecer cuál de las teorías de la evolución sexual en papaya y angiospermas es la que apoyan los resultados.

La ubicación de flores femeninas, intermedias y perfectas dentro de la panícula se asemeja mucho al mismo patrón de flores femeninas-estériles y flores perfectas en la panícula andromonoica. Normalmente las flores femeninas y parcialmente femeninas se localizan en el ápice de la inflorescencia, mientras que las hermafroditas y las flores estériles se ubican

en posiciones secundarias. Esto puede sugerir que los botones flores parcialmente femeninos producen un efecto de dominancia apical y tienen un acceso preferencial a los recursos; y que el acceso restringido de recursos durante el desarrollo del ovario provoca un sesgo hacia el desarrollo de flores femeninas estériles o masculinas. Sin embargo, en cierto punto se pueden llegar a fijar el fenotipo femenino, se mantiene produciendo frutos femeninos a lo largo de su desarrollo. Hay algunos casos en lo que la planta hermafrodita con el fenotipo mutado puede producir desde el comienzo de su desarrollo flores femeninas y la única forma de saber que la planta es hermafrodita es por medio del sexado molecular.

El estudio de esta mutación permitiría ampliar el conocimiento de la aseveración de que las plantas hermafroditas tienen los genes necesarios para producir flores femeninas, pero que son normalmente reprimidos, posiblemente por mecanismos epigenéticos. Pese a los muchos mecanismos moleculares, señales, y genes que afectan el desarrollo de los ovarios y óvulos en las plantas que han sido identificados en las últimas dos décadas, aún se desconocen los genes específicos que controlan la expresión sexual lábil en papaya (Zhiqin Liu et al., 2015; Lunn, Delorge, Figueroa, Van Dijk, & Stitt, 2014). La caracterización genética de esta mutación permitiría llenar este vacío de conocimiento. Además, este trabajo puede ayudar a identificar los genes responsables de la carpelodia. Lo que abre la posibilidad de controlar este problema por medio de herramientas tecnológicas en un futuro.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Caracterizar aspectos morfológicos e histológicos de una mutación sexual en *Carica papaya* (Caricaceae) e investigar sus bases genéticas y moleculares.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar las consecuencias anatómicas de la mutación en flores hermafroditas, femeninas e intermedias en plantas que poseen la mutación.
2. Establecer las bases genéticas de la mutación por medio de cruces controlados.
3. Determinar el locus responsable de la reversión del sexo en el mutante, y proponer genes candidatos.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Trabajos en campo**

Se trabajó con poblaciones F3 y retrocruzas proporcionadas por el proyecto de mejora de papaya UCR-INTA que segregaban la mutación de interés. La población se sembró en la misma densidad que se utiliza en plantaciones comerciales de papaya (2.5 m × 2.5 m). En el experimento se incluyeron los genotipos parentales, sembrados en hileras de 6 plantas de manera aleatoria dentro de cada experimento. Las plantas fueron sembradas en la Estación Experimental los Diamantes, en Pococí, Limón. El manejo agronómico fue el mismo utilizado por Mora y Bogantes (2004).

### **5.2 Sitio de estudio**

Los análisis genéticos e histológicos se realizaron en los laboratorios del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. El análisis de segregación se realizó en la Estación Experimental Los Diamantes en Guápiles de Limón de Costa Rica.

### **5.3 Definición de los procedimientos**

#### **4.3.1 Análisis anatómico de flores**

Para realizar la descripción tridimensional de la mutación en flores hermafroditas, femeninas, masculinas e intermedias se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT).

Muestras de flores pistiladas provenientes de plantas femeninas de fenotipo silvestre<sup>1</sup> perfectas provenientes de plantas hermafroditas de fenotipo silvestre, flores intermedias y pistiladas provenientes de plantas hermafroditas mutadas, se fijaron con la solución fijadora Karnovsky, compuesta por glutaraldehído al 2.5% m/v, paraformaldehído al 0.1 M disuelto en buffer de fosfatos a pH 7.4 por 24 h a 4°C. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces en buffer de fosfato por cinco minutos y se posfijaron en tetróxido de osmio al 2% m/v por 72 horas. Posteriormente, las muestras se deshidrataron a través de un gradiente creciente

---

<sup>1</sup> Es importante mencionar que con “silvestre” se hace referencia a líneas de papayas que no presentan el fenotipo de regresión sexual posiblemente mutado, este viene de la traducción del término en inglés “*wild type*”.

de acetona al 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100 y 100 % v/v durante 15 minutos en cada uno. Finalmente las muestras se secaron por punto crítico, se montaron en bases de aluminio, se recubrieron con una capa de 200 nm de oro, y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM 6390LV (Goodhew et al., 2001; Ronse, L.P.; Smets, 1999; Ronse De Craene et al., 2011). Con el SEM se realizó la comparación de las estructuras tridimensionales que componen el gineceo, en el caso de las flores pistiladas y del androceo, en el caso de las flores perfectas y masculinas, con respecto a las estructuras de las flores intermedias y pistiladas provenientes de plantas perfectas mutadas.

Para el análisis microscópico se siguió el protocolo de Benavides-Acevedo & Bolaños-Villegas (2021) con modificaciones. Un número representativo de muestras de flores mutantes, femeninas, masculinas y hermafroditas se fijaron en la solución fijadora F.A.A. (10% v/v de formalina 37% v/v, 5% de ácido acético glacial, y 85% de etanol 70% v/v) a 25°C por 48 h. Luego las muestras se procesaron para histología. Estas se deshidrataron por medio de un gradiente creciente de alcoholes etílicos de 70, 80, 90 y 95 % v/v. Cada uno de los reactivos se calentaron en microondas hasta alcanzar un rango de temperatura entre 50 y 60°C, y se dejaron 5 min para la estabilización de la temperatura entre cada cambio de alcohol. Para que las muestras se encuentren completamente deshidratadas se les realizaron dos cambios en alcohol etílico al 99.9% v/v, cada uno se calentó en microondas hasta alcanzar un rango de temperatura entre 50 y 60°C, y se dejaron 10 min para la estabilización de la temperatura entre cada cambio de alcohol. Posteriormente, las muestras se aclararon en una solución de alcohol etílico al 99.9% v/v/ y xilol en una proporción 1:1, y en dos cambios de xileno. Cada uno se calentó en microondas hasta alcanzar un rango de temperatura entre 50 y 60°C, y se dejó 10 min para la estabilización de la temperatura entre cada cambio. Finalmente, las muestras fueron incluidas en Paraplast Plus® a través de un cambio en una solución de xilol:Paraplast Plus® en una proporción 1:1, y en dos cambios de Paraplast Plus®, cada uno se mantuvo por 60 min en estufa a 60°C (Buesa, 2007; García, 1993; Leong, 2004; Lillie, 1977; Ronse, L.P.; Smets, 1999; Sandoval, 2005).

Las muestras se cortaron a 5 µm de grosor, se empezó desde la base de la flor y obteniendo un corte cada 100 µm hasta llegar hasta el ápice de la flor. Posteriormente, se incubaron en estufa a 60°C, se desparafinaron, hidrataron, y tiñeron con azul de toluidina al 0.1% m/v disuelto en una solución acuosa saturada de ácido bórico (Sandoval, 2005). Las

microfotografías se tomaron utilizando un microscopio invertido Zeiss Axio con una cámara Olympus DP74.

Se realizó la comparación del desarrollo de las estructuras microscópicas que componen el gineceo, en el caso de las flores femeninas, junto con las del androceo, en el caso de las flores hermafroditas, con las estructuras de las flores mutadas. Además, para determinar el papel de la carpelodia en la generación del fenotipo mutante estudiado se compararon flores pentándricas provenientes de plantas hermafroditas no mutadas con flores pentándricas provenientes de plantas hermafroditas mutadas. También se identificaron la transformación desde una a diez anteras en carpelos en flores provenientes de plantas hermafroditas mutadas.

#### **4.3.2 Segregación de la mutación**

Se evaluaron distintas poblaciones F3 y de retrocruzas, generadas por el proyecto de mejora genética de papaya UCR-INTA BG501. Se realizaron conteos del número de plantas mutadas en el total de la población. De la población F3 se seleccionaron plantas mutadas y se realizaron retrocruzas con ambas líneas parentales para estudiar el patrón de segregación en la siguiente generación.

Se identificaron marcadores moleculares que se correlacionaron con el fenotipo mutado. Estos marcadores se aplicaron a las progenies de cruces entre hermanas que tenían el fenotipo mutado y retrocruces con las líneas paternas para comprobar la presencia molecular de la mutación para compararlo con la segregación del fenotipo mutado encontrado.

#### **4.3.3 Identificación de la regulación genética de caracteres de relevancia agronómica**

Se utilizó una base de datos de marcadores generados por tGBS (Ott et al., 2017) para buscar marcadores asociados con la mutación. La base de datos fue desarrollada por el proyecto Mapeo de loci que controlan caracteres cuantitativos en *Carica papaya* (VI 734-B4-269).

#### **4.3.4 Uso de marcadores moleculares**

##### **4.3.4.1 Extracción de ADN**

Para aislar el ADN se recolectaron discos de tejido en tubos Eppendorf de 2 mL y se liofilizaron, se agregó un balín de acero inoxidable y se maceró en un molino Retsch a 25 Hz por un minuto. Posteriormente al tejido macerado se le agregaron 250  $\mu$ L de buffer de

extracción (compuesto por Tris-HCl al 0.1 M pH 8.0, NaCl al 1.4 M, EDTA al 0.02 M pH 8.0, CTAB al 2 % m/v, y PVP al 2 % m/v), y se mezcló en vórtex. Posteriormente se incubó a 65 °C durante 20 minutos, agitando cada 10 minutos, y se le agregó 250 µL de cloroformo:octanol en una proporción 24:1, se mezcló por inversión de los tubos al menos 20 veces, y se centrifugaron por 5 minutos a 13000 rpm.

Posteriormente se extrajeron 150 µL del sobrenadante y se transfirió a un tubo de 1.5 mL. Se le agregaron 150 µL de isopropanol enfriado a -20 °C y se mezcló por medio de la inversión de los tubos repetida veinte veces. Los tubos se dejaron por 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 13000 rpm. Luego el sobrenadante se descartó, con cuidado de no perder el pellet, y se le agregaron 150 µL de etanol al 70 % v/v enfriado a -20 °C. Se centrifugó por 2 min a 13000 rpm y se descartó el etanol por decantación, y los tubos se colocaron boca abajo sobre una servilleta para eliminar el etanol.

Finalmente, el resto del etanol se secó en una incubadora a 65 °C entre 20 a 30 minutos. El pellet se resuspendió con 25 µL de buffer TE con ARNasa. Por cada 25 µL de muestra se le agregó 1 µL de ARNasa. El ADN se cuantificó por medio de un espectrofotómetro y se diluyó a la concentración adecuada mínima de entre 25 a 30 ng/µL. Posteriormente se almacenó a -20 °C.

#### **4.3.4.2 Determinación molecular del sexo**

Se determinó el sexo de las plantas utilizando el protocolo de qPCR reportado en el trabajo por Araya-Valverde et al. (2019). Se empleó el termociclador CFX384 de Bio-Rad (Hercules, California).

#### **4.3.4.3 Identificación de marcadores moleculares por medio de tGBS**

De la planta mutada original se tomaron semillas originadas por polinización abierta para establecer una M1. Luego se cruzaron plantas mutadas de la M1 para establecer una M2. De la generación M2 se tomaron 12 plantas mutadas y 12 plantas no mutadas.

Para la extracción del ADN se recolectaron discos de tejido en tubos Eppendorf de 2 mL y se liofilizaron, a estos se les agregó un balón de acero inoxidable y se maceraron en un molino Retsch a 25 Hz por un minuto. La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción de Qiagen Plant DNA mini kit (Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Posteriormente las muestras se enviaron a secuenciar a Data2Bio (Ames, Iowa) por medio de tGBS (Ott et al., 2017). Los datos de los marcadores moleculares obtenidos se mapearon con el paquete R/qtl (versión 1.46-2) según el protocolo de Broman & Sen (2009) de mapeo por intervalo. El valor LOD (del inglés *Logarithm of the Odds*, que es una razón de verosimilitud logarítmica) mínimo de significancia se calculó de acuerdo con el protocolo de determinación del umbral de significancia de Broman & Sen (2009). Posteriormente se identificaron los marcadores moleculares cuyo valor LOD superaba el valor LOD mínimo de significancia y su grupo de ligamiento.

Los grupos de ligamiento identificados, que contenían marcadores moleculares cuyo valor LOD superaba el valor LOD mínimo de significancia, se ubicaron en el genoma de papaya y se depuraron según el protocolo de Broman (2012). Una vez depurados los marcadores moleculares fueron mapeados y caracterizados con los paquetes LinkageMapView (versión 2.1.2), devtools (versión 2.3.0) y con qtlTools (versión 1.2.0).

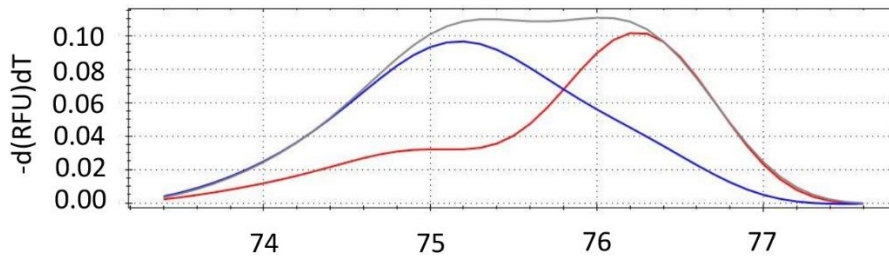
#### **4.3.4.4 Caracterización molecular de la mutación por medio de HRM**

La caracterización molecular de la mutación por medio de HRM se le realizó a la población M4 obtenida del cruce de dos hermanas mutantes de la generación M3. Para comprobar los resultados obtenidos del análisis de QTLs se realizó un análisis de HRM empleando los marcadores principales obtenidos del análisis de QTLs, marcadores en los extremos del mapa de ligamiento del cromosoma 2 y un marcador externo ubicado en el cromosoma sexual, a una población resultante de un cruce F3 de hermanas que presentaban el fenotipo mutado para identificar por medio de HRM los individuos con el fenotipo mutado y silvestre. Se emplearon como controles las líneas parentales P1 y P2 y una planta F1 que presente la mutación, tres repeticiones biológicas de cada uno de los controles.

Se utilizó el equipo de Bio-Rad CFX384. Se empleó la reacción HRM 1X, compuesta por 5  $\mu$ L de Melt Dr., 0.35  $\mu$ L de imprimador forward a 10  $\mu$ M, 0.35  $\mu$ L de imprimador reverse a 10  $\mu$ M, 2.3  $\mu$ L de agua DEPC y 2  $\mu$ L de ADN. Una vez que se identificó una asociación altamente significativa, con un valor de LOD mayor a 3 evaluado en bloques, entre los SNPs y el fenotipo mutante, se procedió a diseñar un marcador molecular tipo HRM. Para esto se localizó la mutación en el genoma de papaya. Se estudiaron 100 pb que flanqueen la mutación. Se diseñaron imprimadores utilizando la herramienta de primer-Blast del NCBI



para amplificar la región que flanqueó el SNP. Los marcadores fueron validados en poblaciones que segregaron la mutación. El análisis de HRM se realizó con el software de Bio-Rad *Precision Melt Analysis* empleando controles de las líneas parentales, P1 y P2, y de la F1 (Figura 1) para realizar la clasificación de las muestras experimentales por clústers.



**Figura 1.** Clasificación del genotipado de acuerdo a los controles parentales (P1 y P2) y F1 de *Carica papaya* por medio de HRM con el software de Bio-Rad *Precision Melt Analysis* del marcador M1482. Control P1 (gris), P2 (azul) y F1 (rojo). d = derivada. RFU = unidades relativas de fluorescencia. T = tiempo.

#### 4.3.4.5 Búsqueda de genes candidatos responsables del fenotipo mutado

Una vez que se identificó el QTL correlacionado con el fenotipo mutado se procedió a ubicar a los marcadores moleculares más significativos que se encuentren dentro del QTL en el genoma de la papaya ASGPBv0.4 (ID de Phytozome: 113) disponible en Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) (Goodstein et al., 2012). Para cada marcador molecular se identificó el supercontig en el que se ubica dentro del genoma y se buscó el transcrito más próximo a dicha ubicación. Además, se realizó una búsqueda en la literatura de posibles genes candidatos de desarrollo floral en otras especies cercanas a la papaya.

#### 4.4 Análisis de datos

Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar. Se realizaron pruebas de chi-cuadrado para definir la proporción de la segregación en las poblaciones mutantes. Todos los análisis se realizaron con el lenguaje de programación “R” (R Core Team, 2020). La base de datos de marcadores generados por tGBS (Ott et al., 2017) se depuró según el protocolo de Broman (2012). Para el análisis de QTL se utilizó el paquete R/qtl (Arends et al., 2010; K. W. Broman et al., 2003) y el mapeo de la mutación se llevó a cabo por medio del análisis para datos binarios.

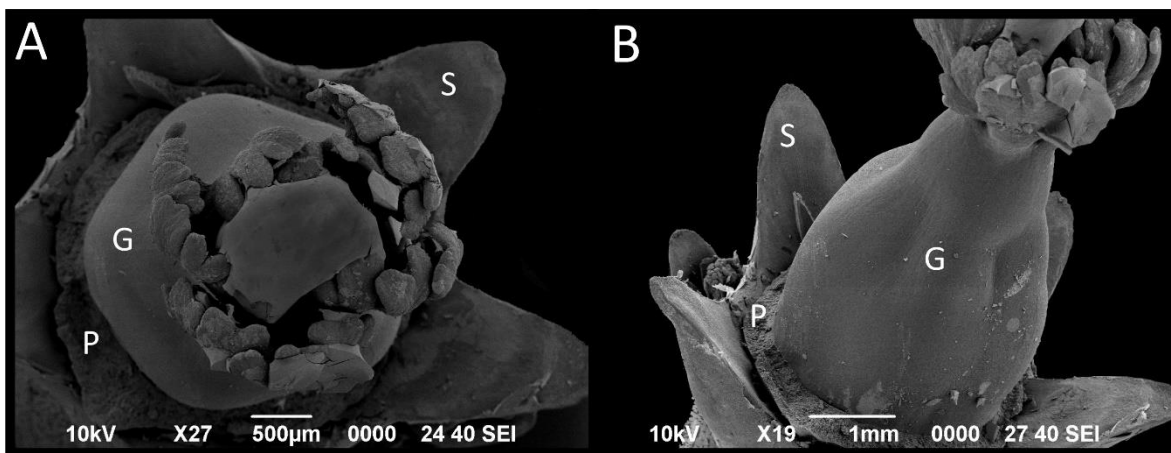
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análisis anatómicos de flores

Para caracterizar las consecuencias anatómicas del fenotipo mutante observado se procedió a realizar microscopía de luz para la descripción histológica y microscopía electrónica de barrido para realizar la descripción tridimensional de las flores. Se realizó la descripción de flores pistiladas provenientes de plantas femeninas silvestres y de plantas hermafroditas con fenotipo mutado, flores perfectas y estaminadas de plantas silvestres.

#### 5.1.1 Flores pistiladas

Tridimensionalmente las flores pistiladas de fenotipo silvestre de papaya se conforman por cinco sépalos, cinco pétalos y por el gineceo (Figura 2). El androceo está completamente ausente.



**Figura 2.** Caracterización tridimensional de una flor pistilada proveniente de una planta femenina de fenotipo silvestre de *Carica papaya*. **A.** Vista del plano vertical. **B.** Vista del plano frontal. G = gineceo. P = cicatriz del pétalo. S = sépalos.

En la base de la flor pistilada los haces vasculares de todos los órganos de la flor se encontraron formando dos cilindros mediales (Figura 3 A) que separa el parénquima cortical del parénquima medular. De estos cilindros vasculares divergieron los haces vasculares de los órganos florales. La flor tuvo una estructura fractal hexagonal que se repite desde la disposición espacial de los órganos florales hasta la forma de las células del parénquima de la flor. Los haces vasculares que irrigan los sépalos, pétalos y, en el caso de las flores

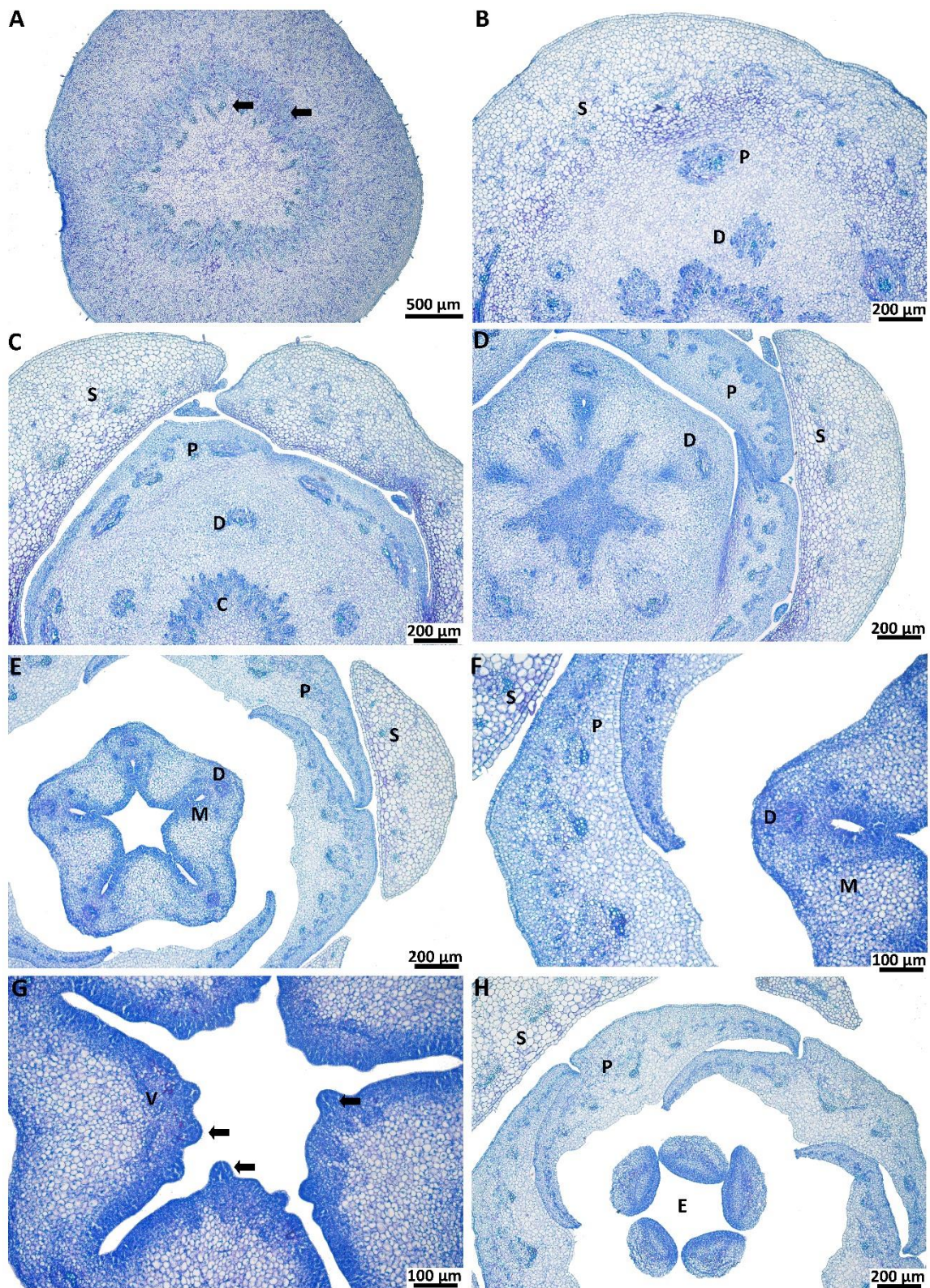
pistiladas, el gineceo, se encontró en cinco vértices equidistantes del centro de la flor, que si se conectan con una línea imaginaria forman un hexágono. Si se analizan los haces vasculares de las flores de papaya de afuera hacia adentro se obtuvo el siguiente orden: 1. Haces vasculares de los sépalos, 2. Haces vasculares de los pétalos, 3. Haces vasculares dorsales. 4. Haces vasculares marginales. 5. Haces vasculares ventrales.

En el primer caso, los haces vasculares más externos fueron los del cáliz, cuyos sépalos se encontraron fusionados en la base de la flor (Figura 3 B) pero se separaron en sépalos con haces vasculares independientes antes de la parte medial del botón floral (Figura 3 C). En el segundo caso, los haces vasculares de la corola, que posee los pétalos fusionados en la mitad basal del botón floral (Figura 3 C), se separaron en la parte medial del botón floral y se alternaron con respecto a los sépalos (Figura 3 D).

En el tercer caso, los haces vasculares dorsales irrigan la parte más externa de los carpelos. Estos se alternaron con los haces vasculares de los pétalos (Figura 3 D y E) y se extendieron a lo largo del tejido del gineceo. En el cuarto caso, los haces vasculares marginales se ubicaron en medio de las invaginaciones placentarias de los carpelos (Figura 3 E y F). En el quinto caso, los haces vasculares internos o ventrales irrigan los óvulos alineados en el lóbulo placentario (Figura 3 G). En la parte superior del botón floral se observó la proyección final de los carpelos, el estilo (Figura 3 H), del cual aparece el estigma.

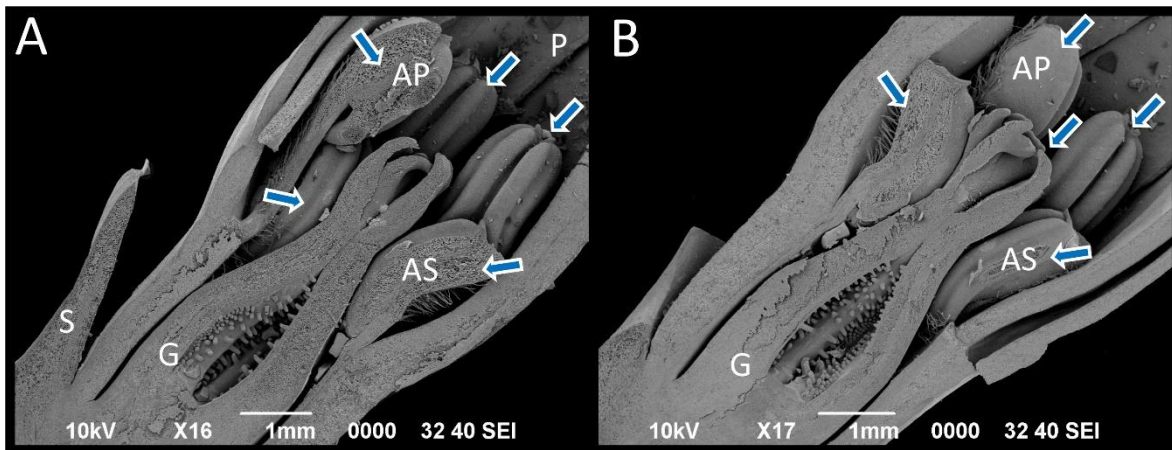
### **5.1.2 Flores perfectas**

La ultraestructura tridimensional de las flores perfectas de fenotipo silvestres de papaya estuvo conformadas por cinco sépalos, cinco pétalos, por androceo y por gineceo. El androceo estuvo formado por cinco anteras del antesépalo y cinco anteras del antepétalo que rodean de forma alternada el gineceo de la flor (Figura 4). Las bases de los botones florales de las flores perfectas tuvieron dos cilindros o halos concéntricos de los que se originan todos los órganos florales conforme se van divergiendo (Figura 5 A y B). El cilindro de haces vasculares más externo va migrando conforme se aleja de la base floral, hasta formar cinco grandes haces vasculares formados por un haz central rodeado por haces más pequeños que corresponden a los haces vasculares del cáliz y de la corola respectivamente (Figura 5 C). Si cada uno de estos haces vasculares se interconectan con una línea forman un pentágono.



**Figura 3.** Morfología microscópica de cortes transversales de flores pistiladas provenientes de plantas de fenotipo silvestre de *Carica papaya* teñidos con Azul de Toluidina. A.

Microfotografías de la base de la flor las flechas señalan los cilindros vasculares interno y externo. **B.** Migración de los haces vasculares de los sépalos y pétalos y dorsales. **C.** Separación de los sépalos del cáliz, surgimiento de la corola y disminución de tamaño del cilindro vascular central. **D.** Microfotografía del medio de la flor, separación de los pétalos de la corola. **E.** Aparición de los haces vasculares mediales. **F.** Detalle de los haces vasculares dorsales y mediales. **G.** Surgimiento de los haces vasculares ventrales. Las flechas señalan el surgimiento de los óvulos. **H.** Microfotografía de la parte superior del gineceo donde se observa el estilo. C = cilindro vascular central. D = haces vasculares dorsales. E = estilo. M = haces vasculares mediales. P = pétalos. S = sépalos. V = haces vasculares ventrales.



**Figura 4.** Caracterización tridimensional de una flor perfecta proveniente de una planta hermafrodita de fenotipo silvestre de *Carica papaya*. Las flechas señalan las anteras. **A y B.** Vistas del plano longitudinal de ambas mitades de la flor. AP = anteras del antepétalo. AS = anteras del antesépalos. G = gineceo. P = cicatriz del pétalo. S = sépalos.

Posteriormente, los haces vasculares de los sépalos migraron hacia la periferia, pasaron de estar fusionados en el cáliz a ser sépalos e individuales (Figura 5 D). Los haces vasculares de los pétalos tuvieron el mismo comportamiento, migraron hacia la periferia y pasan de estar fusionados en la corola a estar separados a partir del medio de la flor (Figura 5 D).

Los 10 filamentos de las anteras del antepétalo se encontraron parcialmente fusionados con los pétalos en la parte inferior de los filamentos (Figura 5 D). A este nivel los haces vasculares dorsales, ventrales y marginales migraron (Figura 5 E). Más arriba los filamentos de las

anteras del antepétalo se liberaron y a este nivel aparecieron los cinco pares de anteras del antesépalo y el comienzo del estilo (Figura 5 F- H).

### **5.1.3 Flores estaminadas**

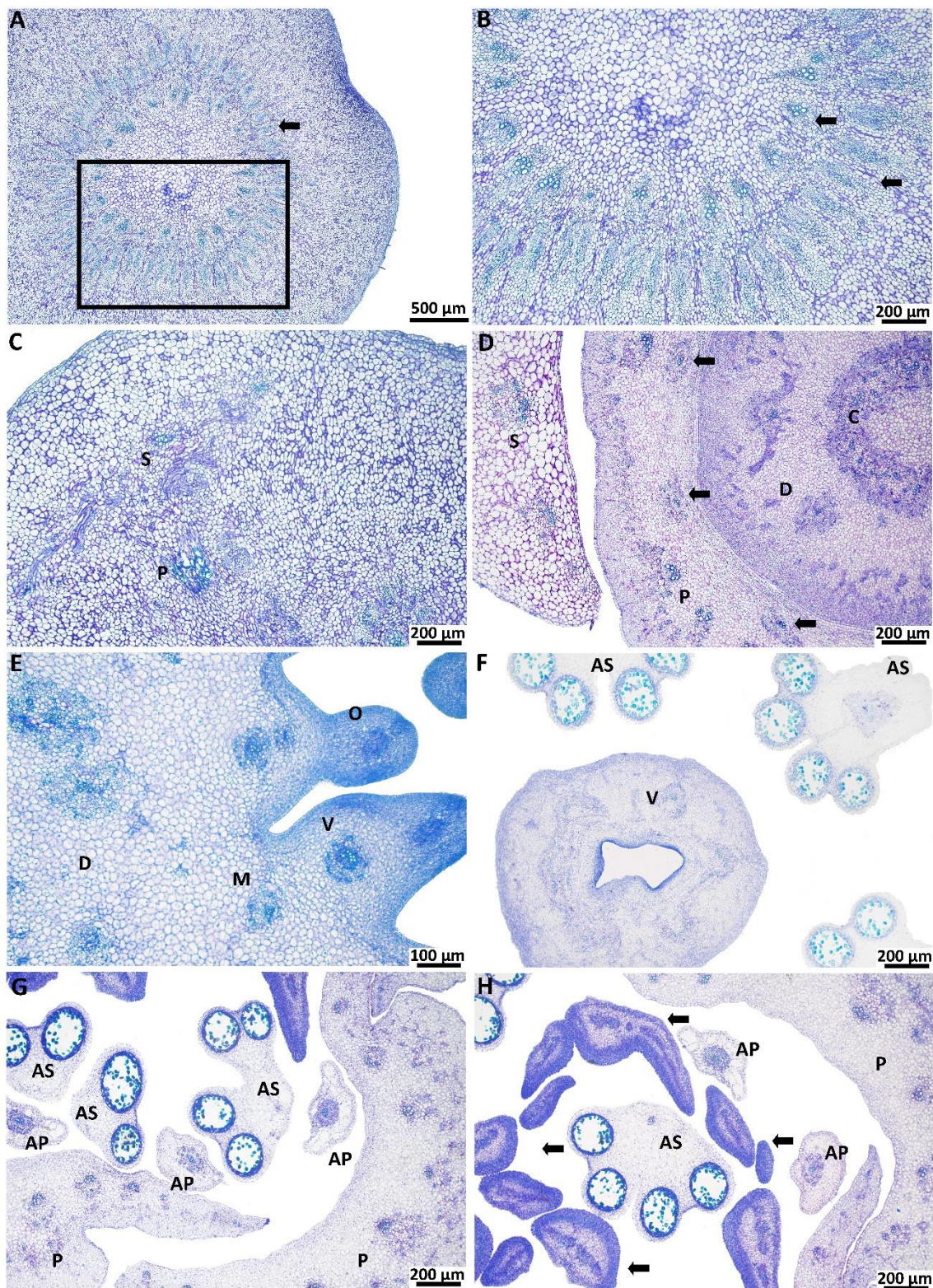
Las flores estaminadas estuvieron formadas por cinco sépalos, cinco pétalos, por el androceo y por un pistilodio. El androceo estuvo formado por cinco pares de anteras del antesépalo y cinco pares de anteras del antepétalo (Figura 6).

En la base del botón floral de flores estaminadas de plantas no mutadas se observaron dos cilindros concéntricos de haces vasculares que posteriormente se van a separar y formar los haces vasculares de los diferentes órganos florales y parte del pedúnculo de una de las flores laterales del botón floral (Figura 7 A). Los primeros haces vasculares en divergir son los de los sépalos y los de los pétalos (Figura 7 B). La anatomía de las flores estaminadas es más sencilla que la de las flores perfectas y pistiladas, las estructuras más importantes fueron las anteras que se visualizan en el medio de la flor los filamentos de las anteras del antesépalo y del antepétalo y el inicio de las anteras del antesépalo (Figura 7 C). Posteriormente los filamentos de las anteras del antesépalo desaparecieron, sólo se visualizaron las anteras del antesépalo propiamente dichas y los filamentos de las anteras del antepétalo (Figura 7 D). Las anteras del antepétalo fueron difíciles de visualizar por medio de cortes histológicos debido a que a la hora de disectar el ápice de la flor, las anteras, al no tener una estructura central de soporte, se caen y pierden su disposición natural.

### **5.1.4 Flores hermafroditas mutadas**

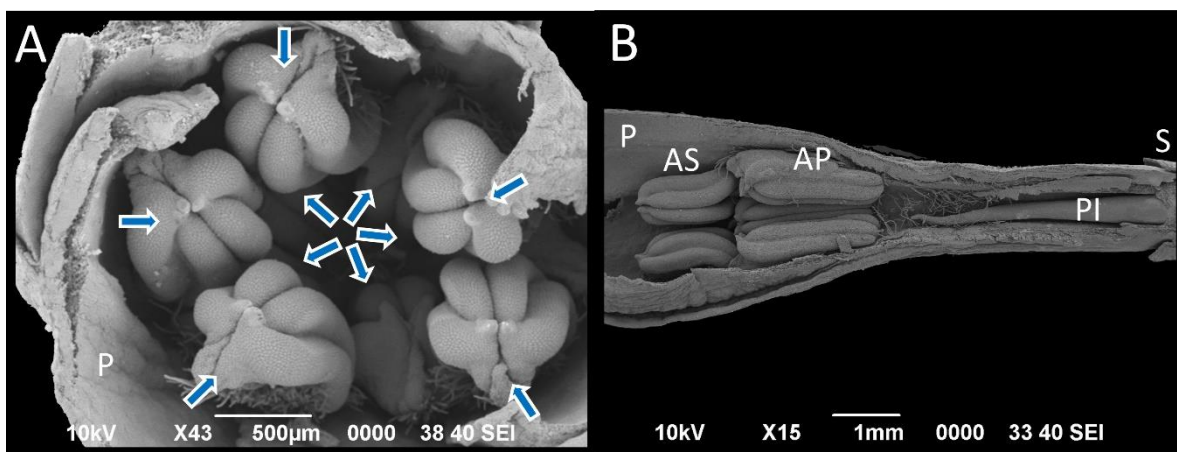
El fenotipo mutado observado en la planta Mutante original y en la mayor parte de la progenie que heredó la característica corresponde a una planta hermafrodita que durante el comienzo de su periodo productivo produjo flores hermafroditas que al desarrollarse generó frutos elongados, característicos de las plantas hermafroditas. Sin embargo, las plantas mutadas a partir de cierto punto, el cual varía dependiendo de la planta, comenzaron a presentar carpelodia y posteriormente a producir flores femeninas que se desarrollaron en frutos redondos, característicos de las plantas femeninas. Estas plantas se mantuvieron produciendo flores femeninas permanentemente. En algunos pocos casos se encontraron algunas plantas hermafroditas mutadas que desde el comienzo de su etapa productiva produjeron únicamente

flores femeninas a lo largo de todo su desarrollo. La única forma de saber que estas plantas eran genóticamente hermafroditas fue realizando un sexado molecular.



**Figura 5.** Morfología microscópica de cortes transversales de flores perfectas provenientes de plantas de fenotipo silvestre de *Carica papaya* teñidos con Azul de Toluidina. **A y B.** Microfotografía de la base de la flor. Las flechas señalan los cilindros vasculares interno y externo. El rectángulo marca el área a la que se aumenta la magnificación en la microfotografía B. **C.** Migración de los haces vasculares de los sépalos y pétalos. **D.** Microfotografía del medio de la flor donde se muestra la separación de la corola y la individualización de los sépalos del cáliz. **E.** Aparición de los haces vasculares mediales, ventrales y surgimiento de los óvulos. **F y G.** Se observan las anteras del antesépalo y del antepétalo. **H.** Microfotografía del ápice de la flor donde se observa el estilo (flechas negras). AP = anteras del antepétalo. AS = anteras del antesépalo. C = cilindro vascular central. D = haces vasculares dorsales. E = estilo. M = haces vasculares mediales. O = óvulos. P = pétalos. S = sépalos. V = haces vasculares ventrales.

Las flores pistiladas provenientes de plantas hermafroditas mutadas estuvieron compuestas por cinco sépalos, cinco pétalos y por el gineceo (Figura 8). El androceo se encontró completamente ausente. Así como en las flores perfectas y pistiladas, en la base de las flores hermafroditas mutadas se encontraron dos cilindros de haces vasculares que separan el parénquima medular del parénquima cortical (Figura 9 A y B). De estos cilindros se originaron los haces vasculares que irrigan a toda la planta.

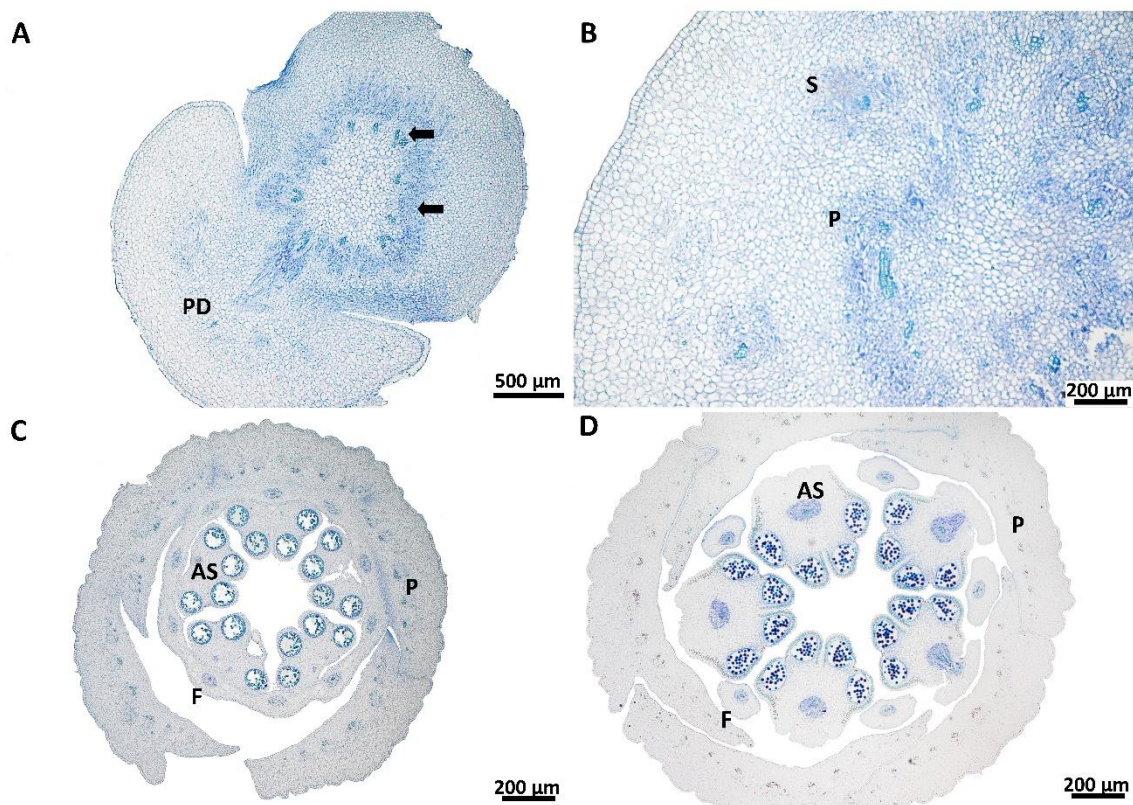


**Figura 6.** Caracterización tridimensional de una flor estaminada proveniente de una planta masculina de fenotipo silvestre de *Carica papaya*. **A.** Visualización del plano vertical de las anteras del antesépalo (flechas internas) y del antepétalo (flechas externas). **B.** Corte longitudinal en el que se observan las anteras del antesépalo, las anteras del antepétalo y el



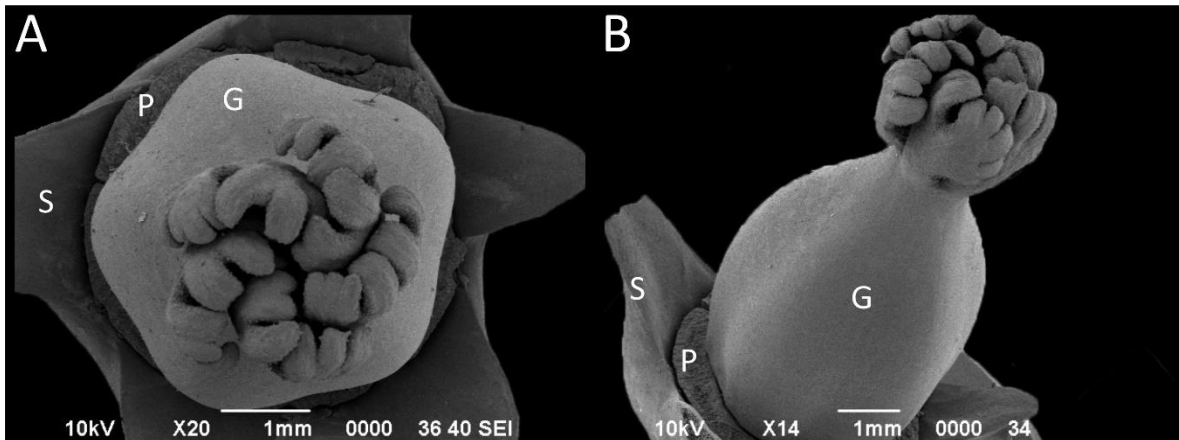
pistilodio (PI). AP = anteras del antepétalo. AS = anteras del antesépalo. P = pétalo. S = sépalo.

Conforme se avanza en la flor se separaron de los cilindros vasculares centrales los haces vasculares de los sépalos y pétalos (Figura 9 C). El cáliz fue el primero en separarse (Figura 9 D) manteniendo los sépalos fusionados en la base y se separaron conforme se avanza hacia el medio de la flor (Figura 9 E). Los pétalos, al principio, también se encontraron fusionados formando la corola (Figura 9 F) y al alcanzar el medio de la flor se separaron (Figura 9 G). Los haces vasculares dorsales, mediales y ventrales surgieron a este nivel (Figura 9 F-H). Los óvulos se irrigan con los haces vasculares ventrales (Figura 9 I y J). No hubo evidencia de anteras en ningún nivel de la flor, ni siquiera en la parte apical de los carpelos (Figura 9 K) que es donde se suelen observar, ni en la parte apical de la flor donde se observó el estilo (Figura 9 L). Esto indicó que las flores hermafroditas mutadas son microscópicamente idénticas a las flores pistiladas.



**Figura 7.** Morfología microscópica de cortes transversales de flores estaminadas provenientes de plantas de fenotipo silvestre de *Carica papaya* teñidos con Azul de

Toluidina. **A.** Base de la flor donde se muestran los cilindros vasculares centrales (flechas) y el pedúnculo de una flor lateral. **B.** Base de la flor con la separación de los haces vasculares de sépalos (S) y pétalos (P). **C y D.** Medio de la flor con los filamentos de las anteras (F) y las anteras del antesépalo (AS). AS = anteras del antesépalo. F = Filamento. P = pétalo. PD = pedúnculo. S = sépalo.



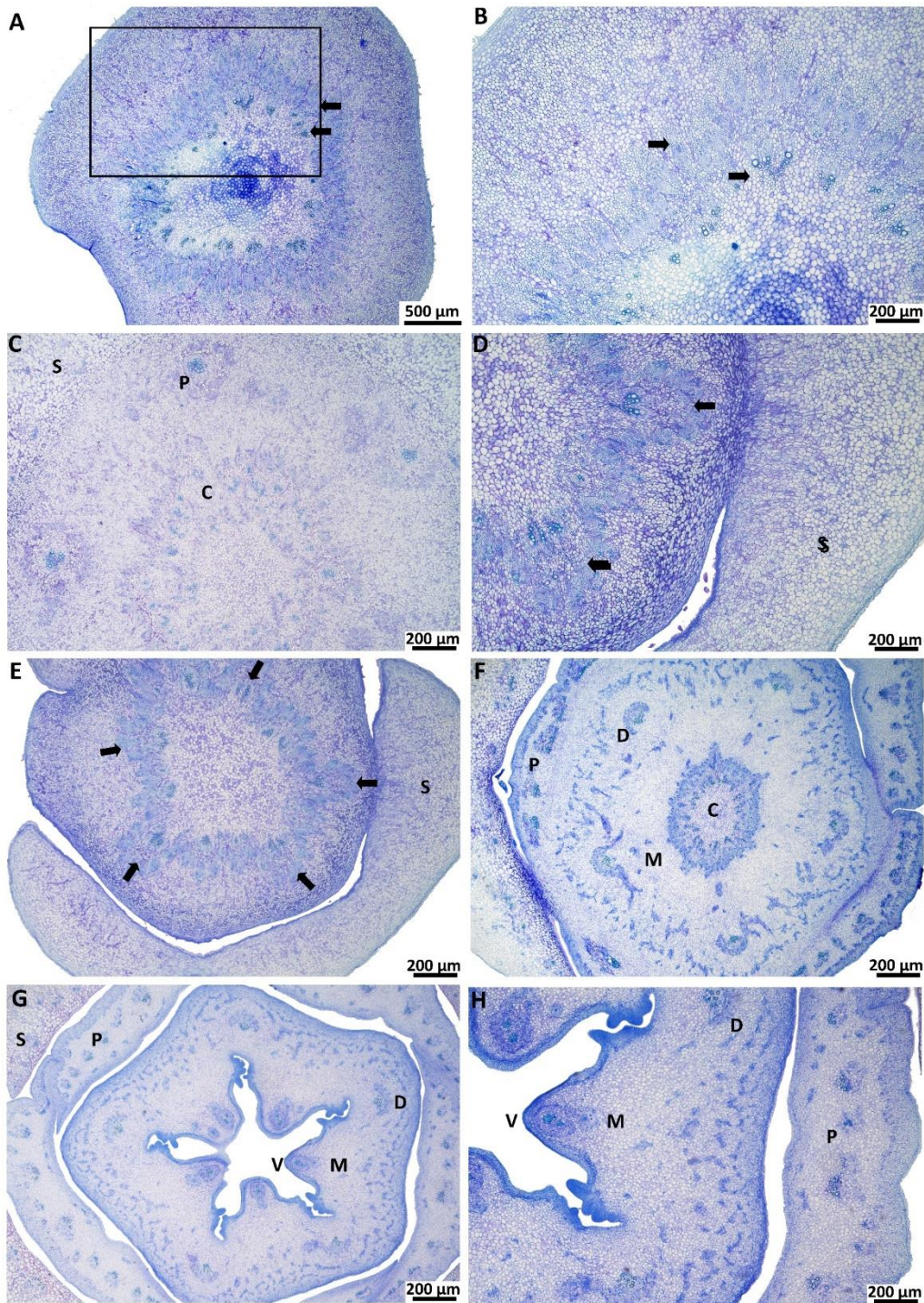
**Figura 8.** Caracterización tridimensional de una flor femenina proveniente de una planta hermafrodita mutada de *Carica papaya*. **A.** Visualización del plano vertical. **B.** Visualización del plano frontal. G = gineceo, P = pétalo, S = cicatriz del sépalo.

### 5.1.5 Flores hermafroditas pentándricas de plantas de fenotipo silvestre

La ultraestructura tridimensional las pentándrica provenientes de plantas hermafroditas de fenotipo silvestre de papaya estuvieron conformadas por cinco sépalos, cinco pétalos, por androceo y por gineceo. El androceo se encontró formado por cinco anteras del antepétalo, el gineceo se encontró engrosado en la posición donde se ubicarían las anteras del antesépalo (Figura 10).

Microscópicamente en la base de la flor se encontraron dos cilindros concéntricos de los cuales se originaron los haces vasculares de todos los órganos de la flor (Figura. 11 A y B). Los sépalos fueron los primeros órganos en divergir (Figura 11 B). La corola se comenzó a individualizar mientras divergieron los haces vasculares dorsales y mediales (Figura 11 C). Posteriormente, antes de la parte medial de la flor los pétalos se individualizaron y surgieron los filamentos de las anteras del antepétalo (Figura 11 D). En los carpelos se pudo observar

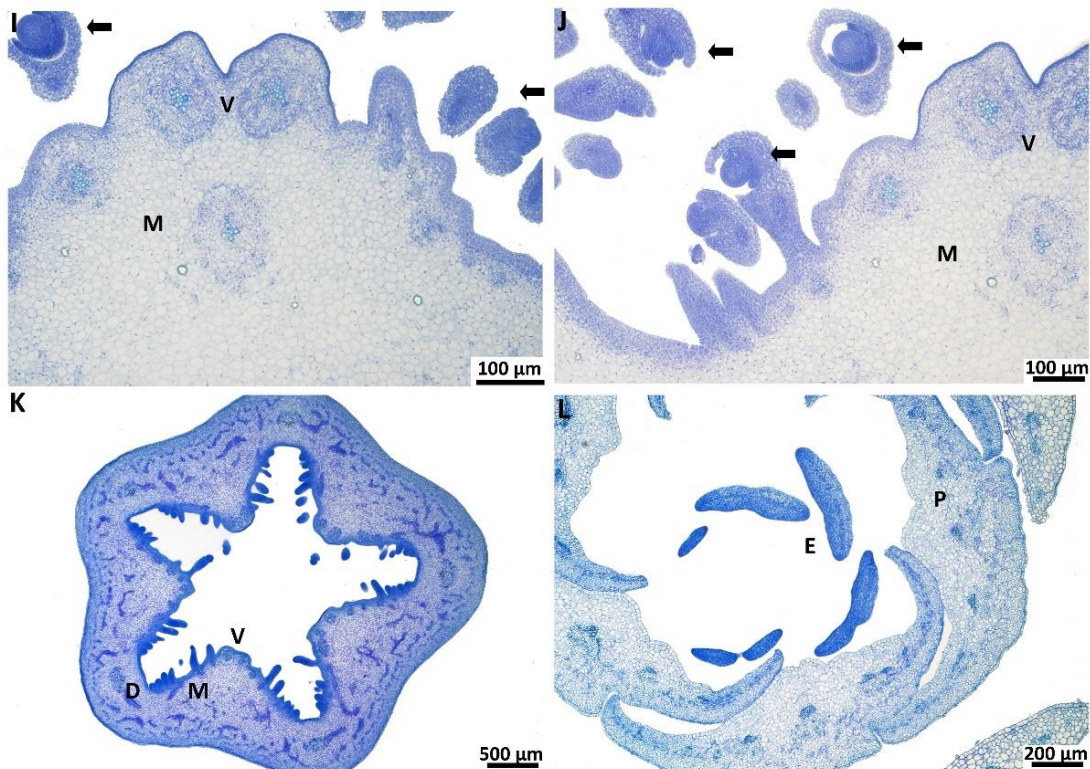
los haces vasculares ventrales y los óvulos (Figura 11 E). En la parte apical de la flor se observaron las anteras del antepétalo y el estilo del gineceo (Figura 11 F).



**Figura 9.** Morfología microscópica de cortes transversales de flores con morfología pistilada provenientes de plantas hermafroditas mutadas de *Carica papaya* teñidos con Azul de

Toluidina. **A.** Microfotografía de la base de la flor las flechas señalan los cilindros vasculares interno y externo. **B.** Acercamiento del cuadro señalado en la microfotografía A. **C.** Migración de los haces vasculares de los sépalos, pétalos y disminución de tamaño del cilindro vascular central. **D.** Surgimiento del cáliz y de los haces vasculares de los pétalos (flechas) y presencia del cáliz aún con los sépalos fusionados. **E.** Separación de los sépalos y definición de los haces vasculares de los pétalos (flechas). **F.** Aparición de los haces vasculares dorsales y mediales. **G y H.** Separación de los pétalos de la corola y aparición de los haces vasculares ventrales (V). **I y J.** Aparición de los óvulos (flechas). **K.** Microfotografía del ápice de los carpelos. **L.** Aparición del estilo. AP = anteras del antepétalo. AS = anteras del antesépalos. C = cilindro vascular central. D = haces vasculares dorsales. E = estilo. M = haces vasculares mediales. P = pétalos. S = sépalos. V = haces vasculares ventrales.

Continuación de Figura 9.

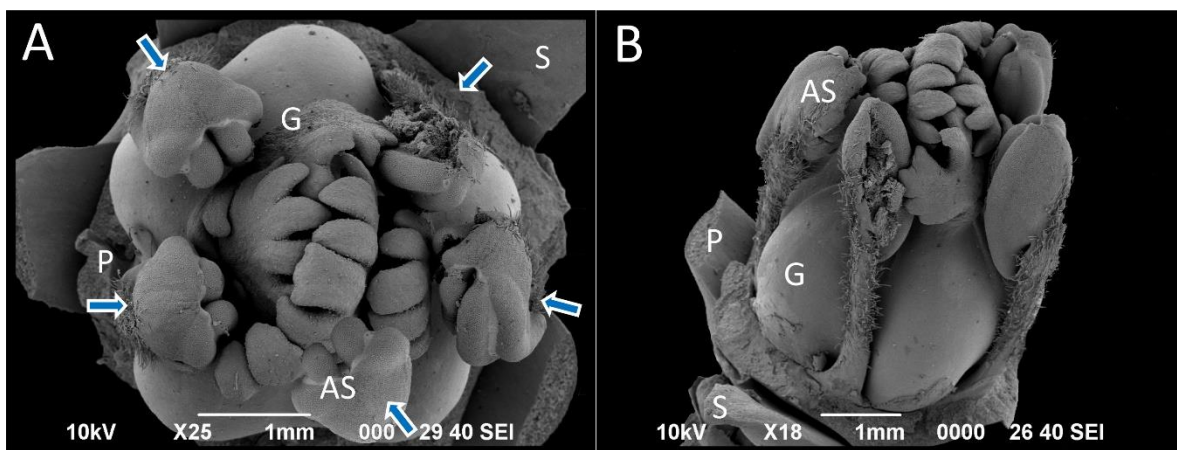


### 5.1.6 Flores hermafroditas pentándricas de plantas mutadas

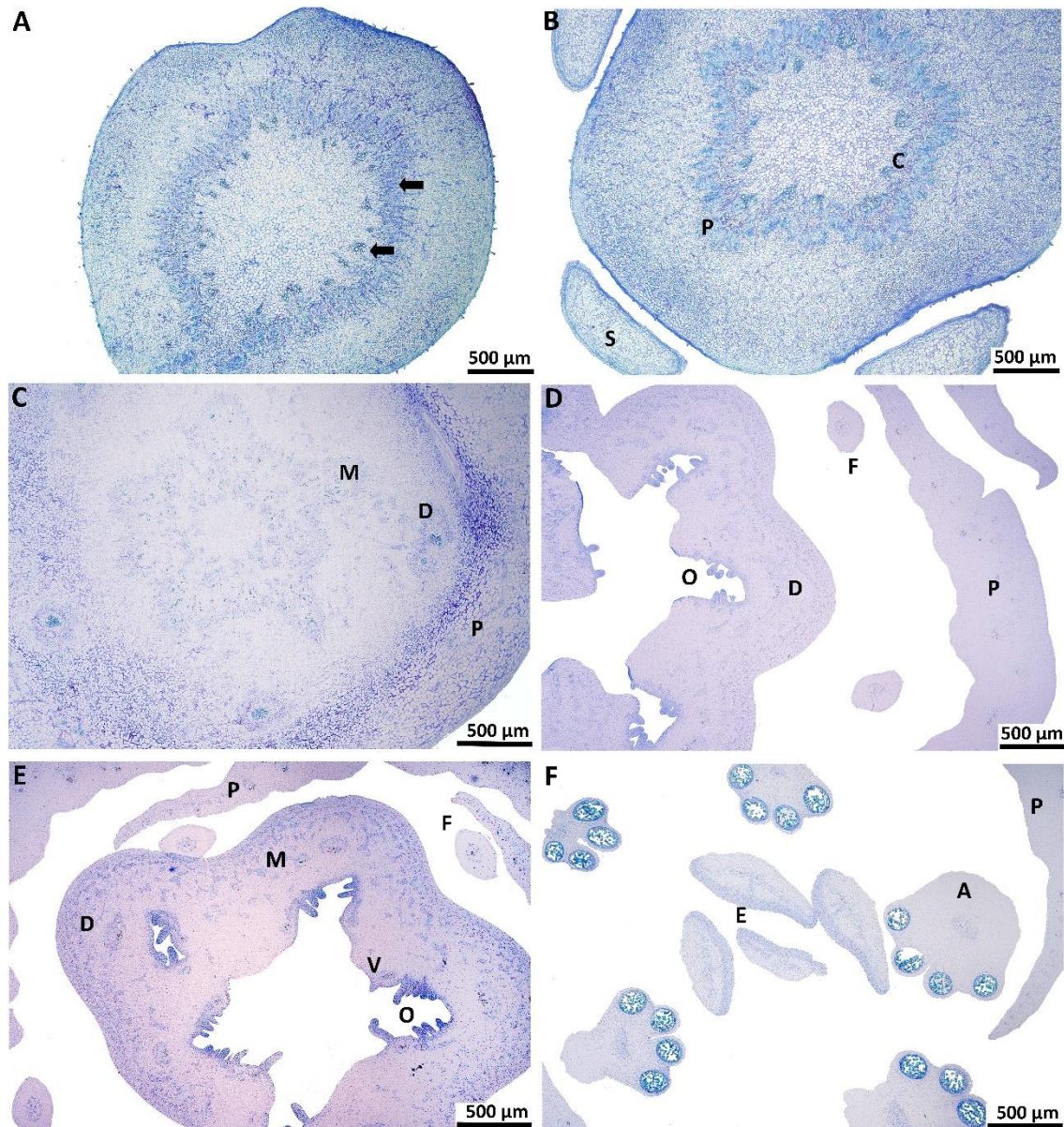
Las flores pentándricas provenientes de plantas hermafroditas mutadas de papaya se encontraron formadas por cinco sépalos, cinco pétalos, por androceo y por gineceo. El androceo se encontró formado por cinco anteras del antepétalo, el gineceo se encontró levemente engrosado en la posición donde se ubicarían las anteras del antesépalo (Figura 12).

Al realizar el análisis histológico se encontró en la base de la flor dos cilindros concéntricos que, conforme se avanza en la flor, formarán los haces vasculares de todos los órganos florales (Figura 13 A). El cáliz y sus sépalos son los primeros que se separaron; al principio se encuentran fusionados, pero rápidamente se separan en sépalos individuales, a este nivel se observaron los haces vasculares de los pétalos aún sin divergir, los haces vasculares dorsales y los mediales (Figura 13 B). Posteriormente la corola se separó (Figura 13 C). En el medio de la flor se pudo observar los haces vasculares medios y ventrales además de los óvulos dentro de los carpelos (Figura 13 D). Luego se pudieron observar los filamentos de las anteras del antepétalo (Figura 13 E) y las anteras con sus granos de polen (Figura 13 F).

Estos hallazgos morfológicos no difieren de los encontrados en flores pentándricas provenientes de plantas de fenotipo silvestre. Así como las flores pistiladas provenientes de plantas hermafroditas mutadas son idénticas a las flores pistiladas provenientes de plantas femeninas de fenotipo silvestre. Esto sugiere que la carpelodia está relacionada con la generación del fenotipo mutado.

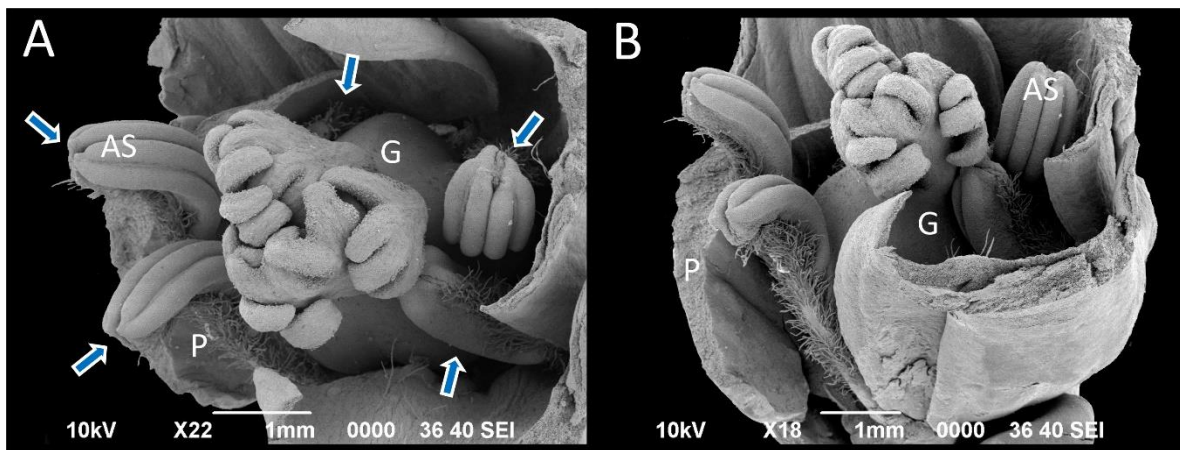


**Figura 10.** Caracterización tridimensional de una flor pentándrica proveniente de una planta hermafrodita de fenotipo silvestre de *Carica papaya*. **A.** Vista del plano vertical. Las flechas señalan las anteras del antesépalo (AS). **B.** Vista del plano frontal. G = gineceo, P = cicatriz del pétalo, S = sépalo.



**Figura 11.** Microfotografía de cortes transversales de flores pentándricas provenientes de plantas de *Carica papaya* hermafroditas no mutadas. **A.** Base de la flor, las flechas señalan los cilindros vasculares centrales. **B.** Sépalos individuales, haces vasculares de pétalos y cilindros vasculares centrales. **C.** Separación de la corola y migración de los haces vasculares

dorsales y mediales. **D.** Medio de la flor donde se muestran los pétalos individuales (P), los filamentos de las anteras y los óvulos. **E.** Parte apical del ovario. **F.** Parte apical de la flor donde se muestran las anteras y el estilo. A = antera. C = cilindro vascular central. D = haces vasculares dorsales. E = estilo. M = haces vasculares mediales. O = óvulos. P = pétalos. S = sépalos. V = haces vasculares ventrales.

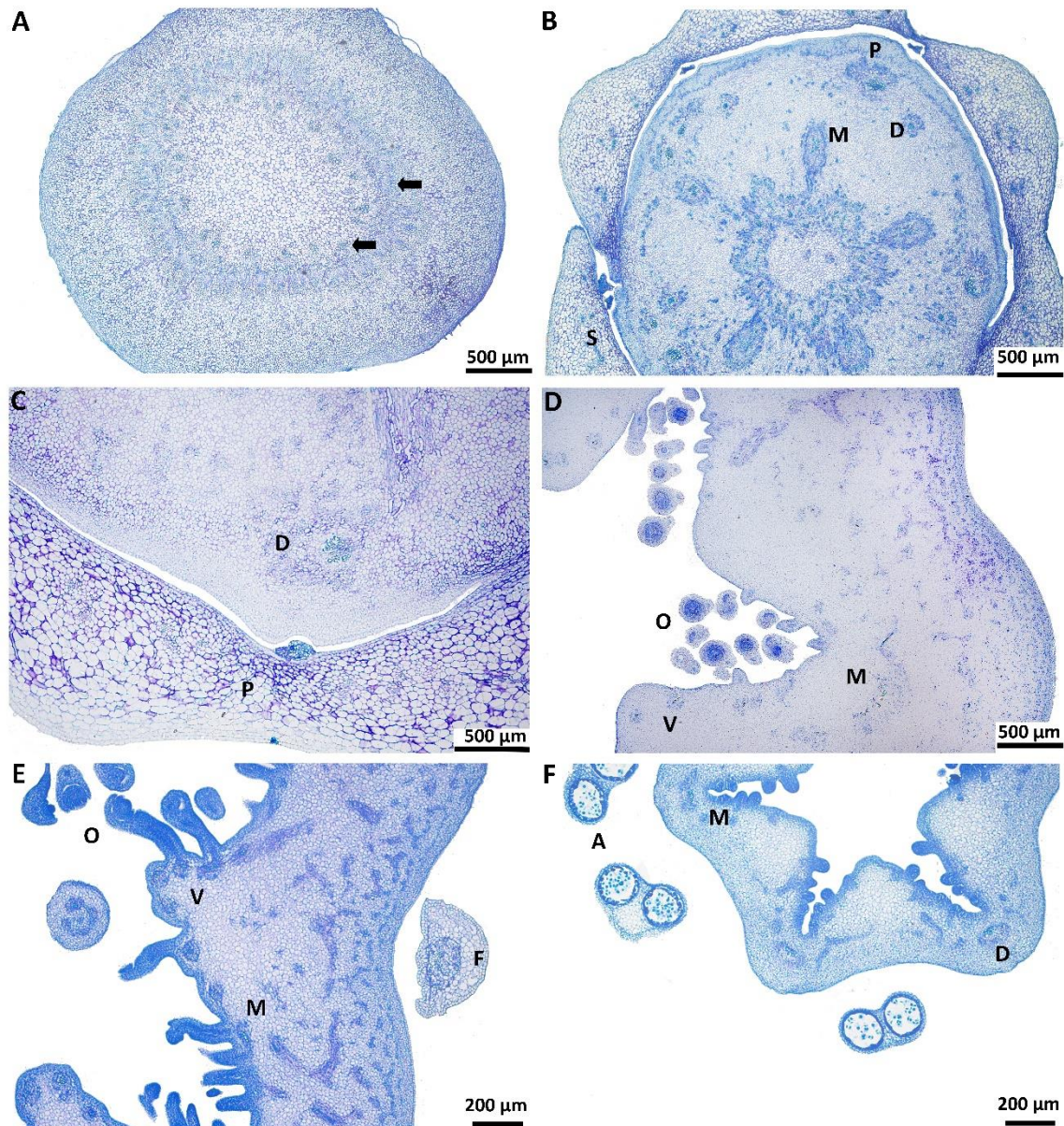


**Figura 12.** Caracterización tridimensional de una flor pentándrica proveniente de una planta hermafrodita mutada de *Carica papaya*. **A.** Vista del plano vertical. Las flechas señalan las anteras del antesépalo. **B.** Vista lateral. AS = anteras del antesépalo. G = gineceo, P = pétalo.

### 5.1.7 Otras flores intermedias de plantas hermafroditas mutadas

En las flores hermafroditas carpelódicas provenientes de plantas hermafroditas mutadas se encontraron flores que tenían desde una hasta diez anteras algunas no carpelódicas y otras carpelódicas (Figura 14 A-J). Se encontraron flores que tenían únicamente anteras no carpelódicas (Figura 15 A), flores que tenían una combinación de anteras carpelódicas y no carpelódicas (Figura 15 B) y flores que tenían únicamente anteras carpelódicas (Figura 15 D). Las anteras carpelódicas se observaron parcialmente fusionadas con los carpelos (Figura 15 B, C, D) y completamente fusionadas con los carpelos (Figura 15 J y Figura 15 E). Se observaron diferentes grados de carpelodia en las anteras, algunas anteras mantuvieron ciertas características propias de las anteras como tricomas posteriores (Figura 15 E, C, E y F) y la morfología superior semejante a la antera propiamente dicha (Figura 15 C). Una observación sobresaliente es que se encontraron anteras carpelódicas que produjeron ovarios externos y mantenían aún características de anteras (Figura 15 E y F).

Microscópicamente se encontraron hallazgos similares a los observados con SEM. Se encontraron filamentos de anteras parcialmente fusionados con los carpelos (Figura 16 A) y fusiones carpelódicas aberrantes que deforman la morfología natural de los carpelos (Figura 16 B y C).

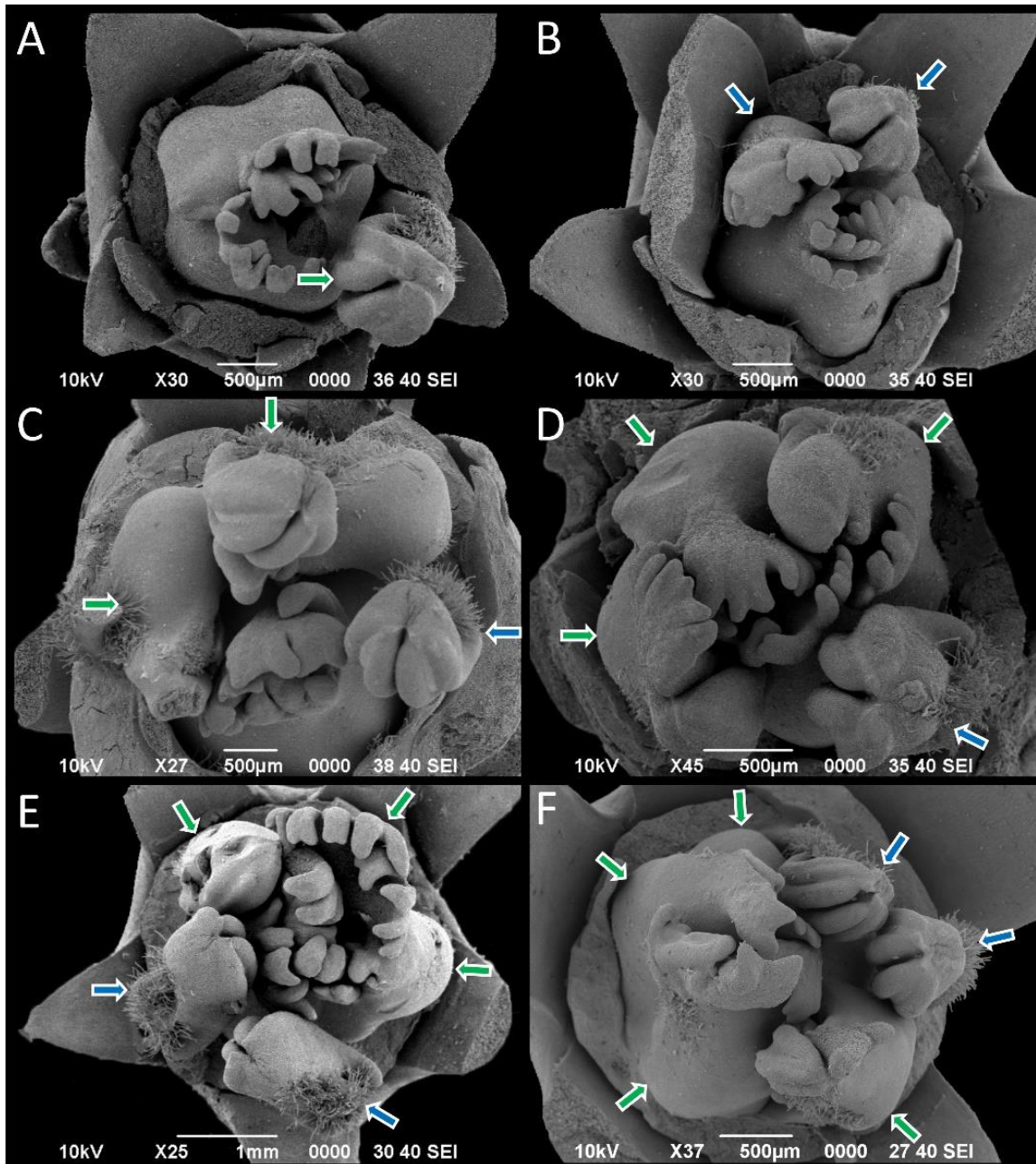


**Figura 13.** Microfotografías de cortes transversales de flores de *Carica papaya* pentándricas provenientes de plantas hermafroditas mutadas. **A.** Base de la flor, las flechas señalan los cilindros vasculares centrales. **B.** Corola, haces vasculares de pétalos, dorsales y mediales.



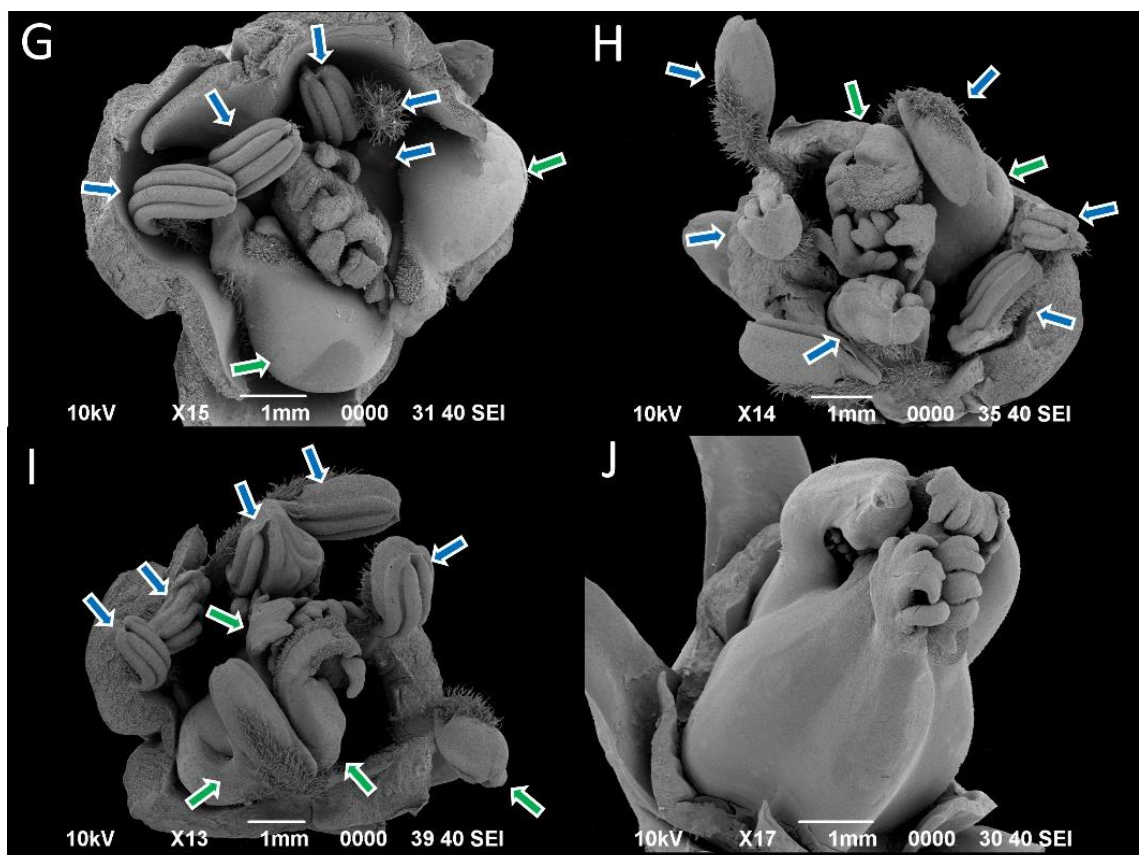
**C.** Corola. **D.** Medio de la flor donde se muestran los haces vasculares ventrales y los óvulos. **E.** Parte apical del carpelo donde se muestran los filamentos de las anteras. **F.** Parte apical del carpelo donde se muestran las anteras. A = antera. C = cilindro vascular central. D = haces vasculares dorsales. E = estilo. F = filamento de la antera. M = haces vasculares mediales. O = óvulos. P = pétalos. S = sépalos. V = haces vasculares ventrales.

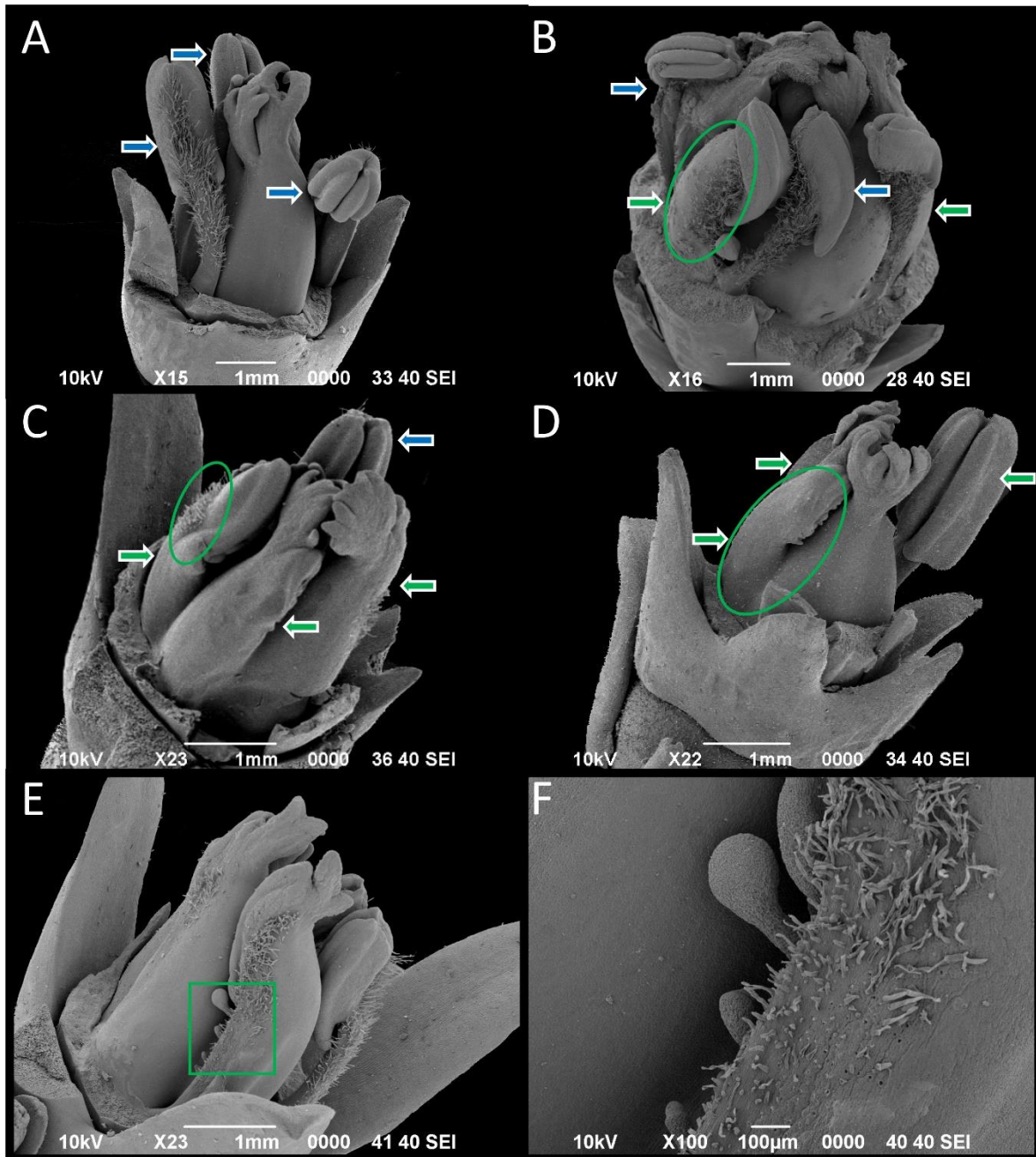
Se observó carpelos que tenían una cavidad expuesta al exterior y anteras carpelódicas parcialmente fusionadas que producían ovarios externos a la cavidad interna (Figura 16 D-F). En algunos casos las cavidades internas de los carpelos se expandieron de los cinco carpelos hasta ocho cavidades (Figura 14 G). Así como en SEM, histológicamente también se observaron anteras carpelódicas parcialmente fusionadas con los carpelos que mantenían características de anteras como la formación de una antera deforme con sacos de polen que producían al mismo tiempo ovarios externos en el medio de la misma estructura (Figura 16 H).



**Figura 14.** Diferentes grados de flores intermedias carpelódicas provenientes de plantas hermafroditas mutadas de *Carica papaya*. Las flechas verdes señalan las anteras carpelódicas y las flechas azules las anteras no carpelódicas. **A.** Una antera. **B.** Dos anteras. **C.** Tres anteras. **D.** Cuatro anteras. **E.** Cinco anteras. **F.** Seis anteras. **G.** Siete anteras. **H.** Ocho anteras. **I.** Nueve anteras. **J.** Ninguna antera con un gineceo deforme.

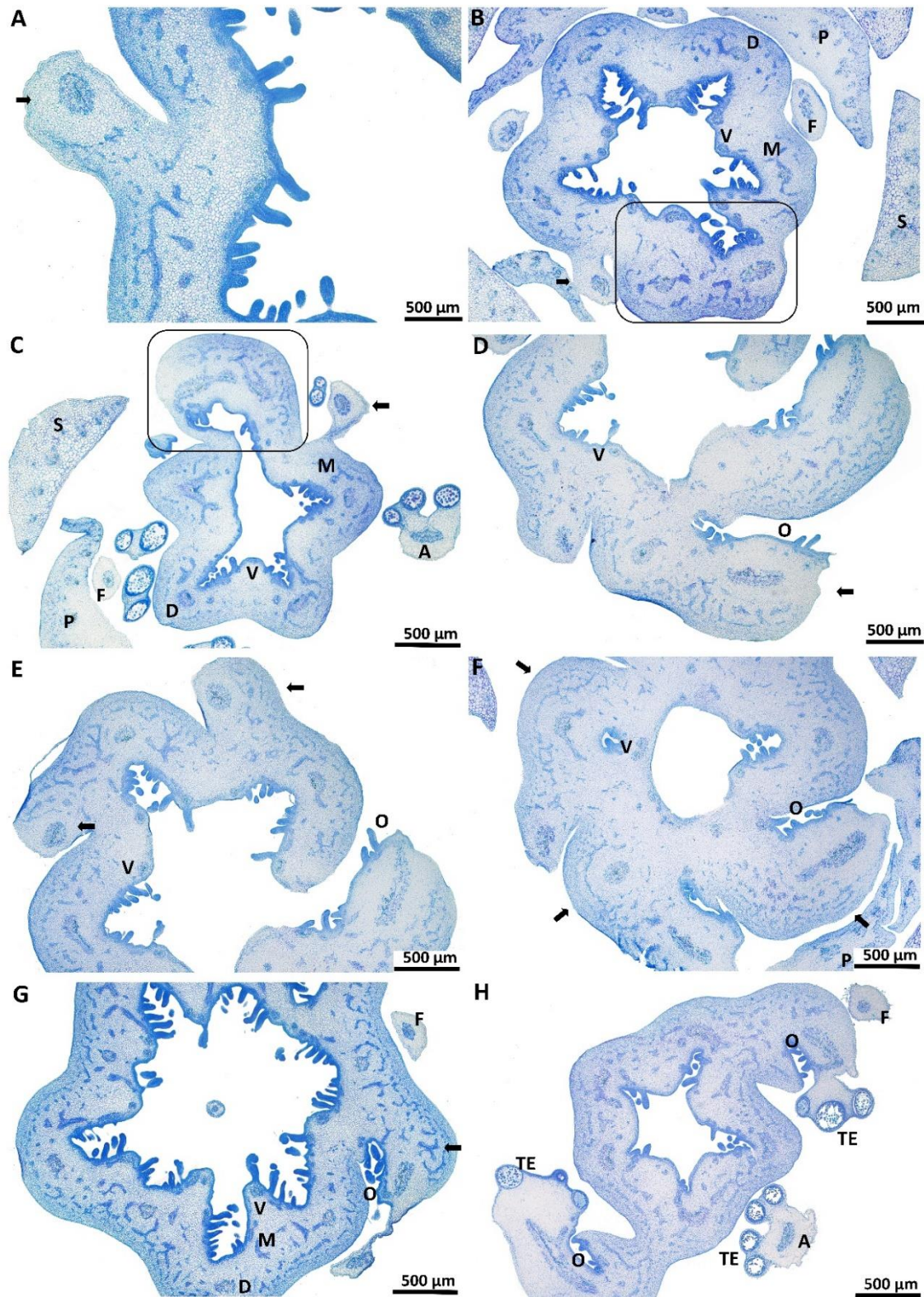
Continuación de la Figura 14.





**Figura 15.** Diferentes fenotipos de anteras encontradas en flores intermedias provenientes de plantas hermafroditas mutadas de *Carica papaya*. Las flechas verdes señalan las anteras carpelódicas y las flechas azules las anteras no carpelódicas. **A.** Flores con tres anteras propiamente dichas. **B.** Flores con anteras propiamente dichas y con anteras carpelódicas. El óvalo verde señala una antera carpelódica con fusión parcial con los carpelos que mantiene los tricomas posteriores característicos de las anteras. **C.** La antera de la izquierda mantiene sus tricomas (círculo verde), la antera del centro tiene una fusión parcial con los carpelos y

la antera de la derecha presenta una fusión casi total con los carpelos. **D.** Vista lateral de una antera con una fusión parcial los carpelos (círculo verde) que perdió sus rasgos de antera. **E.** Antera carpelódica que presenta ovarios externos (cuadro verde) y los tricomas característicos de las anteras. **F.** Acercamiento de los ovarios externos de la antera carpelódica.

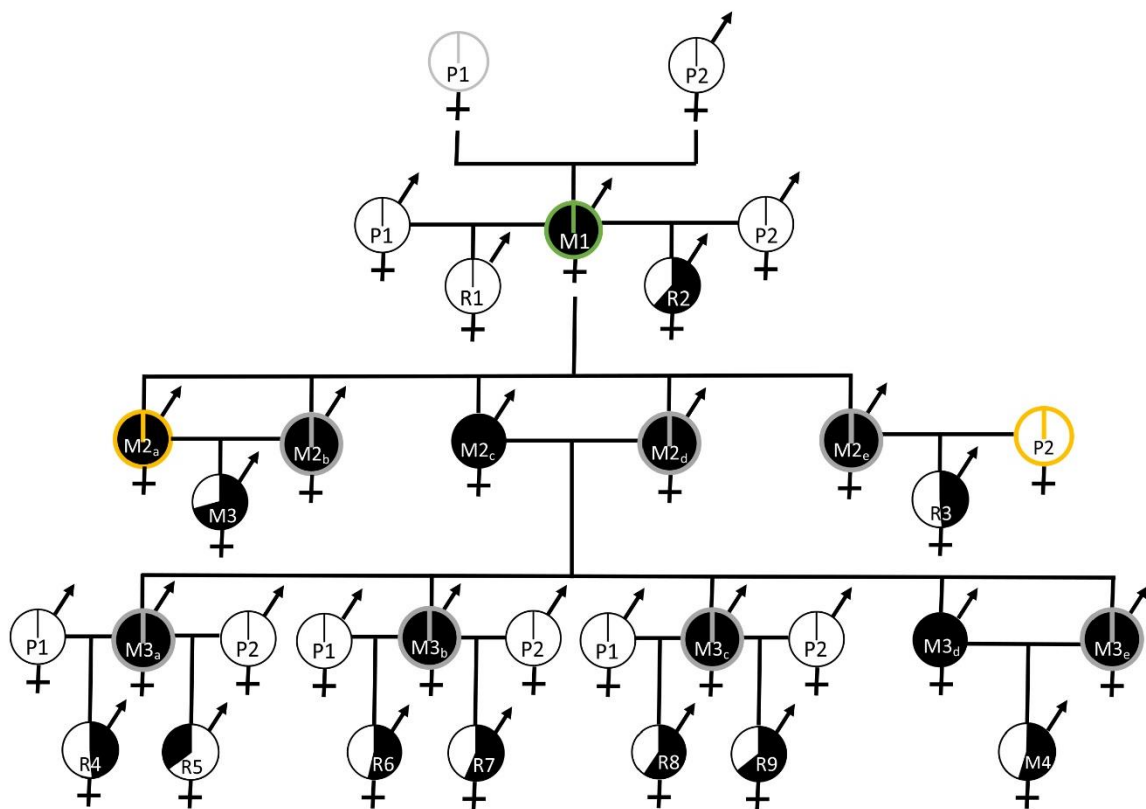


**Figura 16.** Microfotografías de cortes transversales de flores de diferentes grados de carpelodia provenientes de plantas hermafroditas de *Carica papaya* mutadas. **A.** Corte

proveniente de una flor con ninguna antera normal y dos anteras carpelódicas. Se muestra una antera carpelódica (flecha) con fusión parcial. **B.** Corte proveniente de una flor con tres anteras normales y tres anteras carpelódicas. Se muestran pétalos, filamentos de anteras, haces vasculares dorsales, mediales y ventrales. **C.** Corte proveniente de una flor con ninguna antera normal y dos anteras carpelódicas. En el cuadro se encuentran dos anteras carpelódicas con fusión completa. La flecha señala un filamento carpelódico con fusión parcial. **D.** Corte proveniente de una flor con cuatro anteras normales y seis anteras carpelódicas. Se muestran óvulos. **E y F.** Cortes provenientes de una flor con cuatro anteras normales y seis anteras carpelódicas. Las flechas señalan anteras carpelódicas con fusión parcial. **G.** Cortes provenientes de una flor con cinco anteras normales y seis anteras carpelódicas. La flecha señala una antera carpelódica con fusión parcial. **H.** Cortes provenientes de una flor con ocho anteras normales y dos anteras carpelódicas. Se muestran anteras y tejido esporógeno. A = anteras. C = cilindro vascular central. D = haces vasculares dorsales. E = estilo. F = filamentos de anteras. M = haces vasculares mediales. P = pétalos. S = sépalos. TE = tejido esporógeno. V = haces vasculares ventrales.

## 5.2 Segregación de la mutación

La mayoría de los cruces y retrocruces realizados (Figura 17) se ajustaron a una segregación 1:1 ó 3:1 (Cuadro 1). Únicamente el cruce M1 × P1 no se ajustó a ningún patrón de segregación debido a que toda la población resultó sin la mutación. Si el fenotipo mutante observado es causado por una mutación dominante que sigue un patrón de segregación mendeliano, se esperaba que la progenie de los retrocruces de plantas mutantes con las líneas parentales segregara la mutación en una proporción de 1:1, así como se observa en el cruce M2<sub>e</sub> × P2, M3<sub>a</sub> × P1, M3<sub>b</sub> × P1, M3<sub>b</sub> × P2 y M3<sub>c</sub> × P1 (Cuadro 1 y Figura 17). Sin embargo, en algunos retrocruces el patrón de segregación no se pudo determinar posiblemente debido a que la población era muy pequeña, como en M1 × P2, M3<sub>a</sub> × P2 y M3<sub>c</sub> × P2 (Cuadro 1 y Figura 17).



**Figura 17.** Cruces y retrocruces realizados para analizar el patrón de segregación de la mutación de regresión sexual en *Carica papaya*. Los bordes grises de los círculos representan plantas que se tomaron como femeninas para realizar el cruce, los negros que se tomaron como masculinas, el verde que se tomó como femenina en el retrocruce y se polinizó de



forma abierta para generar la siguiente generación y los amarillos que se tomaron flores pentándricas para realizar el cruce. Los círculos vacíos corresponden a plantas o generaciones no mutadas, los rellenos de negro corresponden a plantas mutadas, y los que están rellenos parcialmente de negro corresponden a gráficos tipo pastel en donde se representa de forma proporcional el número de plantas mutadas (negro) y de no mutadas (blanco) de una generación determinada. P = línea parental. M = cruce mutado. R = retrocruce.

En el caso de los cruces entre hermanas mutantes, si la mutación es dominante, se esperaba que la progenie heredara la mutación en una proporción 3:1 (mutantes:no mutantes) como en el caso de los cruces  $M2_c \times M2_d$  y  $M3_c \times P1$  (Cuadro 1 y Figura 17). Sin embargo, se encontraron cruces entre hermanas mutantes que tuvieron un comportamiento anormal, en donde el genotipo de los padres no puede deducirse de forma lógica a partir de la segregación observada en la población. Por ejemplo,  $M2_a \times M2_b$  heredó la mutación en una proporción 1:3 (mutantes:no mutantes) y  $M3_d \times M3_e$ , que es el cruce que tiene una mayor cantidad de individuos ( $n = 138$ ), segregó con una proporción 1:1 (Cuadro 1 y Figura 17). Esto indica que es posible que el fenotipo mutante observado no sea causado por una mutación genética sino más bien por un cambio epigenético heredable, que la mutación no es monogénica o que la mutación sólo está en condición heterocigota.

**Cuadro 1.** Patrón de segregación de la mutación de regresión sexual de cruces y retrocruces de *Carica papaya* evaluadas fenotípicamente en el campo con sus respectivos genotipos hipotéticos. La prueba de  $\chi^2$  es para probar una segregación 1:1 y 3:1 de mutantes con respecto a no mutantes. *a* = alelo no mutado. *A* = alelo mutado. *NE* = no existe. *S* = segregación.

<b>Cruce</b>	<b>Mutado</b>	<b>No mutado</b>	<b>Dudoso</b>	<b>S 1:1 valor p =</b>	<b>Genotipos hipotéticos</b>	<b>S 3:1 valor p =</b>	<b>Genotipos hipotéticos</b>
1. M1 × P1	0	20	0	<0.01	-	<0.01	-
2. M1 × P2	8	5	0	0.40	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	0.26	NE
3. M2 <sub>a</sub> × M2 <sub>b</sub>	5	12	4	0.08	NE	<0.05	-
4. M2 <sub>c</sub> × M2 <sub>d</sub>	25	11	0	0.02	-	0.44	<i>Aa</i> × <i>Aa</i>
5. M2 <sub>e</sub> × P2	16	17	1	0.86	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	<0.01	-
6. M3 <sub>a</sub> × P1	21	20	1	0.88	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	<0.01	-
7. M3 <sub>a</sub> × P2	11	6	2	0.22	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	0.32	NE
8. M3 <sub>b</sub> × P1	22	19	3	0.64	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	<0.01	-
9. M3 <sub>b</sub> × P2	13	10	0	0.53	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	0.04	-
10. M3 <sub>c</sub> × P1	19	13	1	0.29	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	0.04	-
11. M3 <sub>c</sub> × P2	18	10	0	0.13	<i>Aa</i> × <i>aa</i>	0.19	NE
12. M3 <sub>d</sub> × M3 <sub>e</sub>	63	75	0	0.30	NE	<0.01	-

### **5.3 Uso de marcadores moleculares**

#### **5.3.1 Determinación molecular del sexo**

Los controles hermafrodita, femenino y blanco amplificaron de la forma esperada y su curva de fusión de ADN permitió diferenciar de forma correcta las plantas hermafroditas, en cuya curva de fusión de ADN aparecen dos picos, y las plantas femeninas, en cuya curva de fusión de ADN aparece un único pico (Figura 18), de todas las poblaciones que formaron parte de esta investigación. La segregación del sexo en todas las poblaciones es de 2:1, plantas hermafroditas:femenina, respectivamente (Cuadro 2). Esto es esperado debido a la naturaleza de los cruces, donde fueron cruzadas únicamente plantas hermafroditas.

#### **5.3.2 Caracterización molecular de la mutación de regresión sexual**

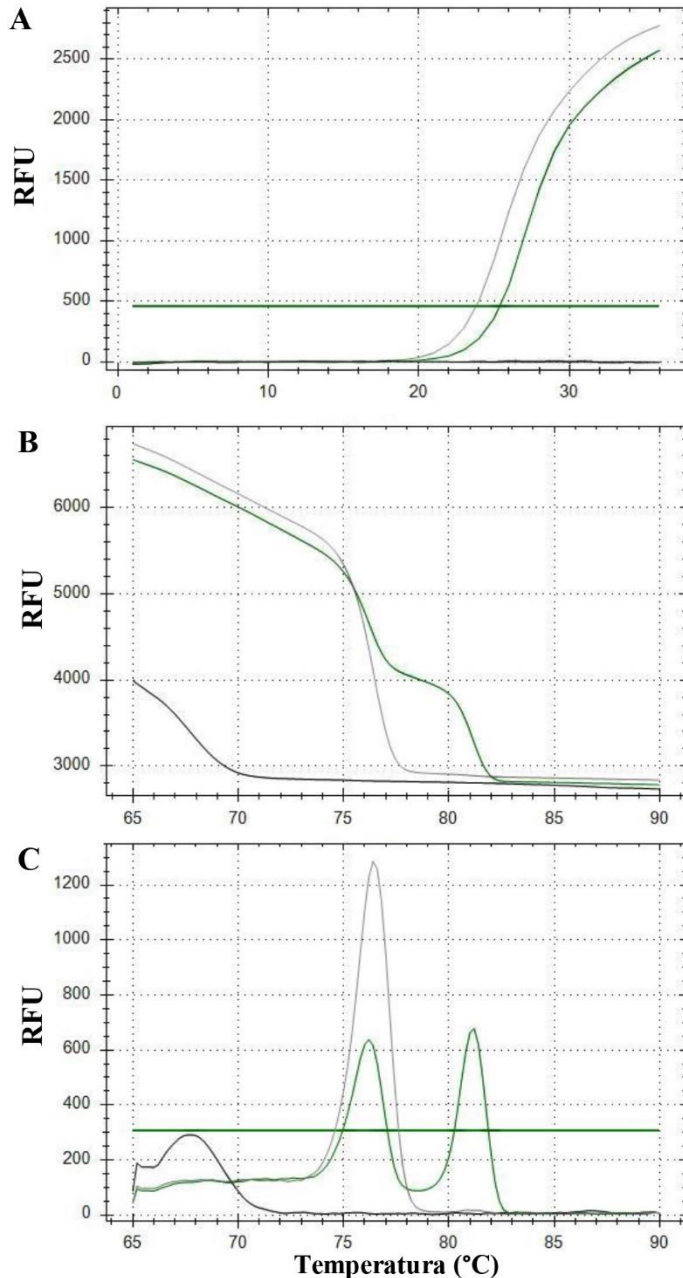
Para determinar el locus o los loci causantes del fenotipo mutado se procedió a realizar análisis de marcadores moleculares por medio de HRM obtenidos por medio de una base de datos obtenido por medio de tGBS. Además, se empleó el análisis de QTLs para realizar esta caracterización.

##### **5.3.2.1 Identificación de marcadores moleculares por medio de tGBS**

La base de datos de marcadores moleculares generados por tGBS (Ott et al., 2017) generó marcadores moleculares a lo largo del genoma de *C. papaya* de los cuales se encontraron marcadores moleculares en el cromosoma 2 que tuvieron un valor LOD mayor a 4.12 (Figura 19), que es el valor LOD límite obtenido con un análisis de 1500 permutaciones sobre el cual se encuentran marcadores moleculares que se correlacionan con el fenotipo mutado con un  $p < 0.05$ .

La depuración de la base de datos de marcadores moleculares generados por tGBS (Ott et al., 2017) del cromosoma 2 según el protocolo de Broman (2012), el cual se especificará más adelante, permitió identificar marcadores con posibles errores técnicos que podrían afectar el mapeo de la mutación. Dentro los marcadores moleculares originales encontrados en el cromosoma 2, hubo marcadores con una fracción de recombinación mayor a 0.5 y con valores LOD mayores a 1 (Figura 20 A), que puede indicar que tienen sus alelos cambiados o que poseen datos perdidos. Conforme se avanzó en la depuración de los marcadores moleculares se eliminaron o corrigieron los alelos de los marcadores moleculares con valores LOD

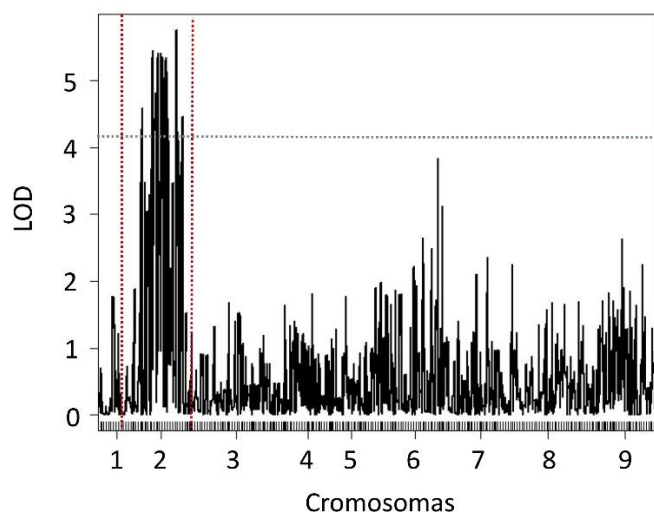
mayores a 4 (Figura 20 B), hasta lograr la depuración final de casi todos los marcadores moleculares que tienen un LOD mayor a 1 y una fracción de recombinación mayor a 0.5 (Figura 20 C).



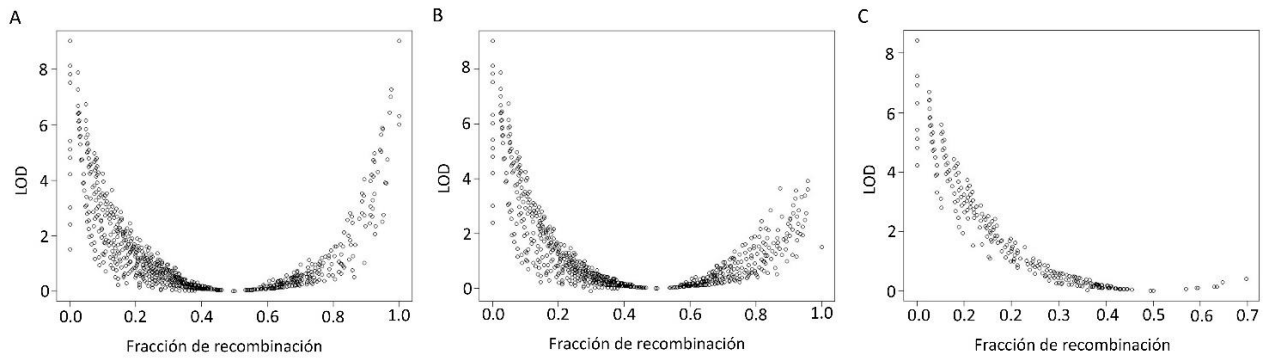
**Figura 18.** Curva de fusión de ADN de los controles hermafrodita (verde), femenino (gris) y blanco (negro) de *Carica papaya*. La línea verde paralela al eje X representa el umbral límite de amplificación. **A.** Curva de amplificación de qPCR. **B.** Curva de fusión del ADN. **C.** Pico de fusión de ADN. RFU = unidades relativas de fluorescencia.

**Cuadro 2.** Sexado molecular en cinco poblaciones distintas de *Carica papaya* por medio de qPCR. La prueba de  $\chi^2$  es para probar una segregación 2:1. “H” se refiere a hermafrodita, “F” a femenina.

Población	Plantas evaluadas	Plantas Femeninas	Plantas Hermafroditas	$\chi^2$ valor p
1. M14 HM $\times$ P1 H	72	24	48	1
2. M32 HM $\times$ P2 H	63	21	42	1
3. M32 HM $\times$ P1 H	76	25	51	0.94
4. M28 HM $\times$ P2 H	77	27	50	0.74
5. M28 HM $\times$ P1 H	79	31	48	0.26
6. M14 HM $\times$ P2 H	61	16	45	0.24



**Figura 19.** Análisis de QTLs por medio de marcadores derivados de la secuenciación por tGBS realizada a plantas mutadas y no mutadas de *Carica papaya*. **A.** Mapeo de los marcadores moleculares a lo largo de los 9 cromosomas de la papaya. Las líneas punteadas rojas delimitan el cromosoma 2. La línea punteada gris indica el valor LOD límite obtenido por un análisis de permutación ( $n = 1500$ ).



**Figura 20.** Valor LOD con respecto a la fracción de recombinación de los marcadores moleculares obtenidos por tGBS en individuos mutantes y no mutantes del cromosoma 2 de *Carica papaya*. **A.** Marcadores moleculares originales. **B.** Marcadores moleculares parcialmente depurados. **C.** Marcadores moleculares depurados finales.

El mapa de ligamiento del cromosoma 2 generó un cromosoma de 120 cM (centimorgan) (Figura 21) y un valor LOD límite, obtenido por un análisis de 1500 permutaciones, de 2.5. Todos los marcadores moleculares que se encontraron sobre este valor LOD fueron correlacionados con el fenotipo mutado a un valor  $p \leq 0.05$ .

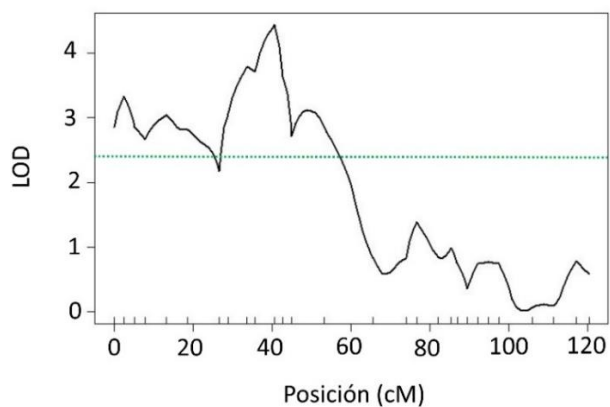
El mapeo de marcadores moleculares se realizó a lo largo del genoma y en detalle en el cromosoma 2 de individuos que presentaban el fenotipo mutado e individuos que mantenían el fenotipo silvestre (Figura 22). Al observar los genotipos de los distintos individuos (Figura 22 A), se encontró que la mayor parte de marcadores en el cromosoma 2 (Figura 22 B) son mutantes homocigotas o heterocigotas.

Con la base de datos depurada se procedió a estimar un nuevo mapa de ligamiento y se encontró que los marcadores moleculares del cromosoma 2 se distribuyeron a lo largo de aproximadamente 120 cM (Figura 23 A). Estos 120 cM corresponden a una distancia física de 28.9 Kb. Los marcadores moleculares en el cromosoma 2 con un valor LOD mayor a 2.5 permite diferenciar los alelos de los genotipos homocigotas silvestres (B), heterocigotas mutantes (H) y homocigotas mutantes (A) en unidades relativas (Figura 23 B-E). El QTL encontrado en el cromosoma 2 se encuentra entre el M1160 (33.8 cM) y el M88 (42.8 cM).

Los marcadores que tuvieron valores de LOD significativos permitieron diferenciar los genotipos B de H y A (Figura 22 B). La expresión diferencial de estos genotipos en M214

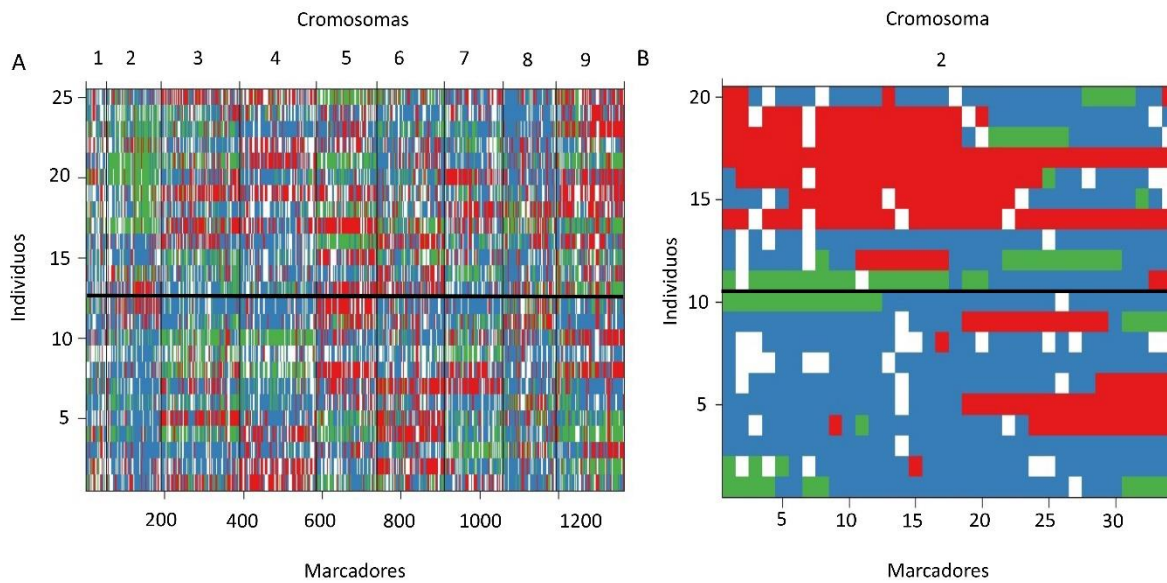
(Figura 23 B), M1482 (Figura 23 C) y P142 (Figura 23 D), mostraron una diferencia entre el genotipo B y A de 1.0 unidades relativas de fenotipo, mientras que el marcador M1586, que tuvo un valor LOD de 0.82 y mostró una diferencia entre el genotipo B y A de 6.5 unidades relativas de fenotipo. En el caso del marcador M214 se encuentra levemente por encima del umbral límite de LOD significativo (2.86). El genotipo H se encuentra en todos los casos cercano al genotipo A, separados por una diferencia de entre 0.2 y 0.1 unidades relativas de fenotipo (Figura 23 B-D), a excepción del marcador M111 en el que tiene una diferencia de 0.25 unidades relativas de fenotipo. Es importante resaltar que si bien la mayor parte de individuos H se encontraron en 0.0, que es el valor en unidades relativas en donde se ubican todos los alelos A, hay algunos pocos que se encontraron en 1.0 que correspondería a B (Figura 23 B-E).

En este mapa de ligamiento también se estimaron las frecuencias de recombinación (Figura 24 A) y valores LOD (Figura 24 B). En el triángulo superior izquierdo se observa que las fracciones de recombinación de los marcadores moleculares poseen una baja recombinación con marcadores cercanos. Es decir, los marcadores que están ligados tienen una recombinación muy baja; los que están en cromosomas diferentes la recombinación es mayor a 0.35-0.5. Se encontraron en total 9 marcadores moleculares en el cromosoma 2 de *C. papaya* que se correlacionan con el fenotipo mutado de forma significativa. El marcador molecular M1482 fue el marcador con el valor LOD más alto que se encontró y se ubica a 40.72 cM en el cromosoma 2. Cerca del M1482 se encontraron el M1161 a 35.85 cM y el P142 a 53.35 cM con valores LOD altos (Cuadro 3).



**Figura 21.** Análisis de QTLs del cromosoma 2 de la secuenciación por GBS realizada a plantas mutadas y no mutadas de *Carica papaya*. Las líneas punteadas verdes indican el valor

LOD límite (de acuerdo con un  $\alpha = 0.05$ ) obtenido por un análisis de permutación ( $n = 1500$ ).  
cM = centimorgan. LOD = razón de verosimilitud logarítmica.

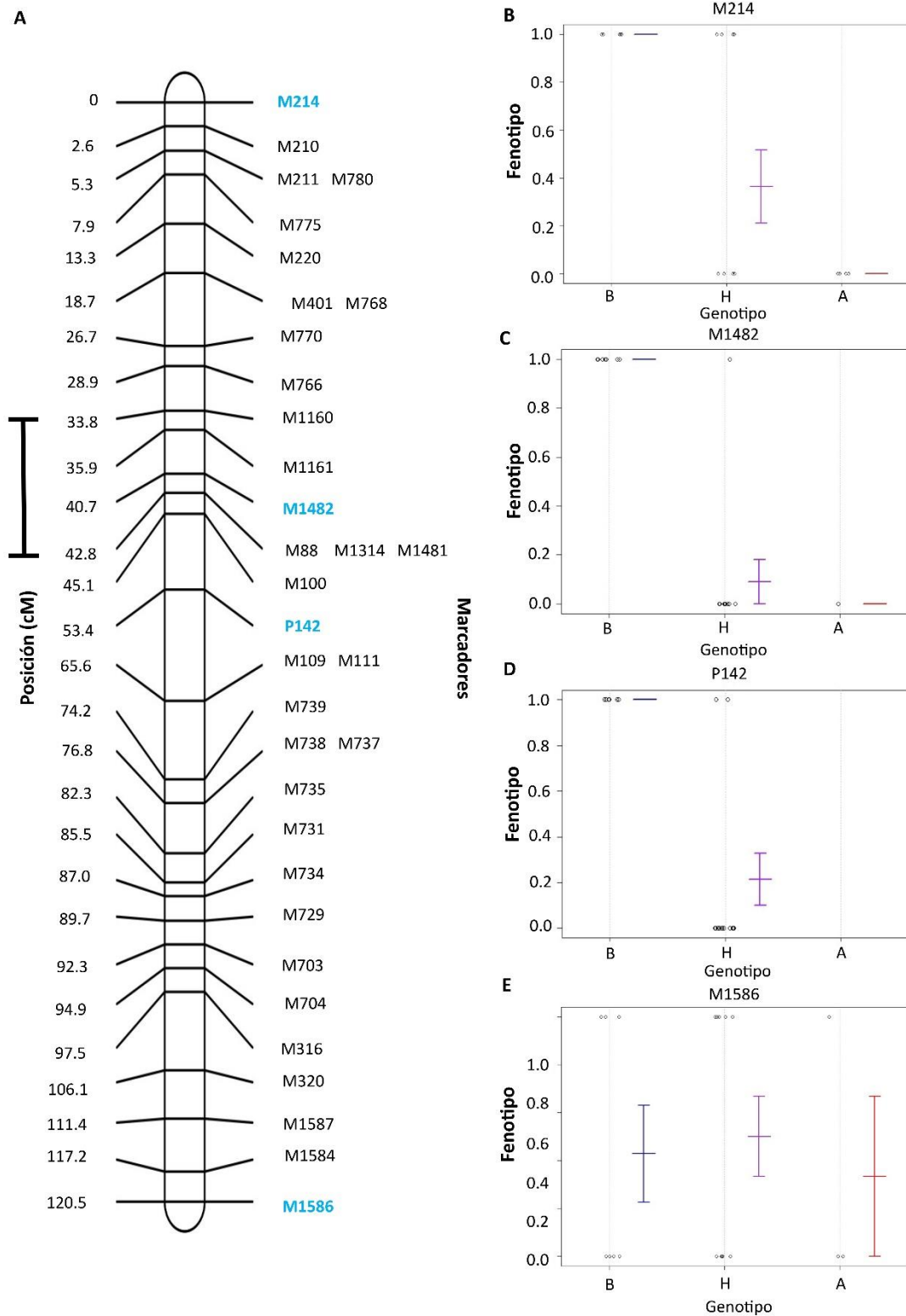


**Figura 22.** Genotipos de plantas mutadas y control en *Carica papaya*. **A.** Todos los cromosomas de la papaya. **B.** Cromosoma 2 de la papaya. Los colores indican el genotipo según lo siguiente: AA = rojo. Aa = azul. aa = verde. NAs = blanco. Las plantas que se encuentran sobre la línea negra son individuos mutadas, las que están por debajo no lo son.



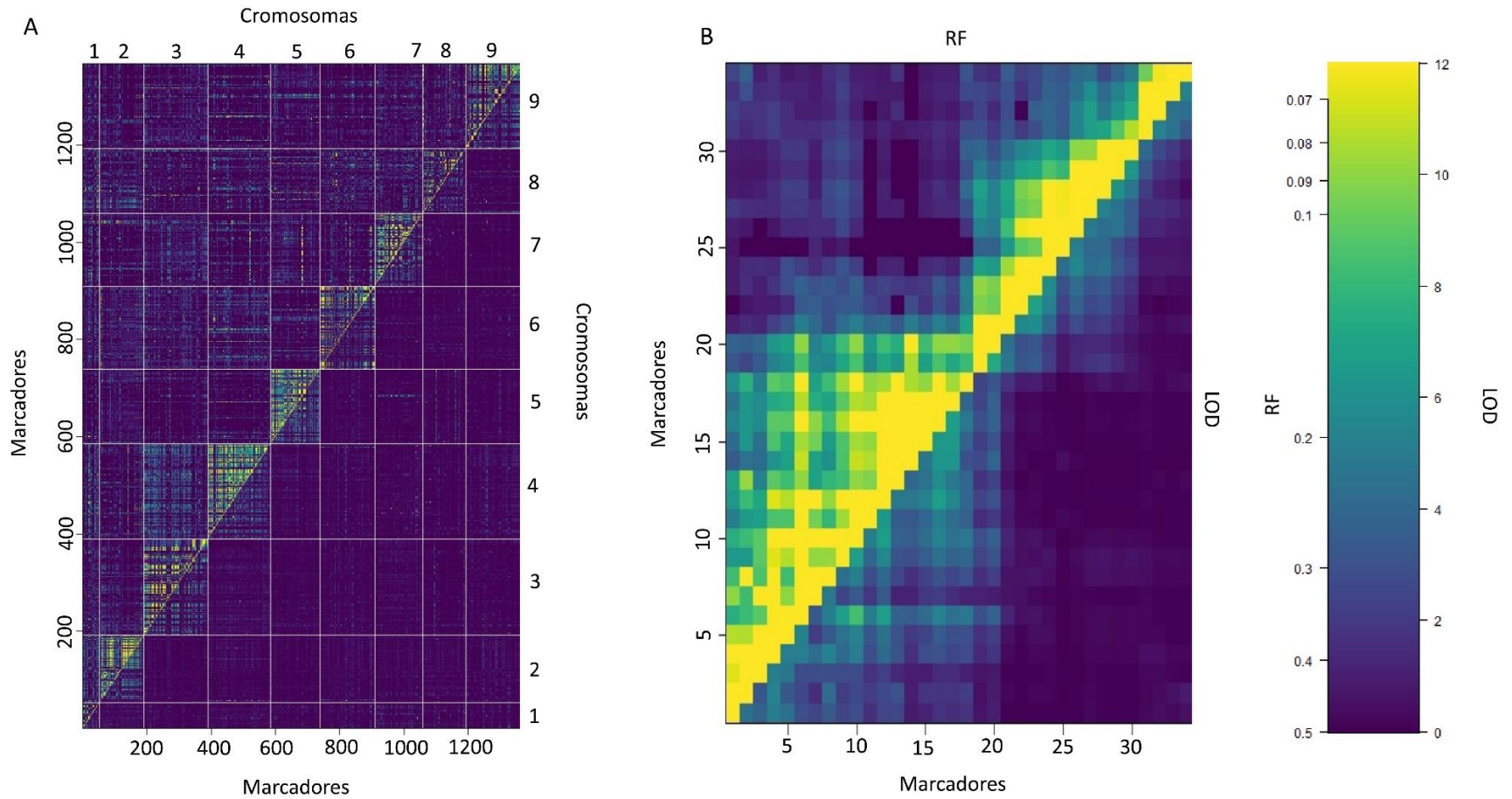
**Cuadro 3.** Resumen de los marcadores moleculares más significativos para una mutación de regresión sexual en *Carica papaya*. cM = centimorgan. LOD = razón de verosimilitud logarítmica.

Nombre	Posición de QTL				
	Cromosoma	Pico (cM)	Marcador más cercano	Valor LOD	Promedio LOD $\alpha = 0.05$
H-F201	2	2.63	M214	3.72	2.50
H-F202	2	13.35	M220	3.42	2.50
H-F203	2	18.33	M401	3.23	2.50
H-F204	2	28.93	M766	3.42	2.50
H-F205	2	33.78	M1160	4.90	2.50
H-F206	2	35.85	M1161	4.81	2.50
H-F207	2	40.72	M1482	7.36	2.50
H-F208	2	42.81	M1481	4.72	2.50
H-F209	2	53.35	P142	3.31	2.50



**Figura 23.** Mapa de ligamiento del cromosoma 2 de *Carica papaya* (A). Los marcadores resaltados en color celeste corresponden a marcadores que se analizan en el panel derecho de

la figura. La barra ubicada a la izquierda señala la ubicación del QTL en el cromosoma 2. Plots diferenciales de los marcadores moleculares M214 (B), M1482 (C), P142 (D) y M1586 (E) de acuerdo con el genotipo con respecto al fenotipo (unidades relativas de fenotipo). Las plantas ubicadas en 1.0 corresponden a los fenotipos mutados y las que están en 0.0 a los fenotipos no mutados. Se muestra el promedio  $\pm$  D.E.



**Figura 24.** Representación de la comparación de las fracciones de recombinación (RF) (triángulo superior izquierdo) y del valor LOD para estimar el ligamiento (triángulo inferior derecho) de los marcadores moleculares obtenidos para el análisis de QTL. **A.** genoma de *Carica papaya*. **B.** Cromosoma 2.

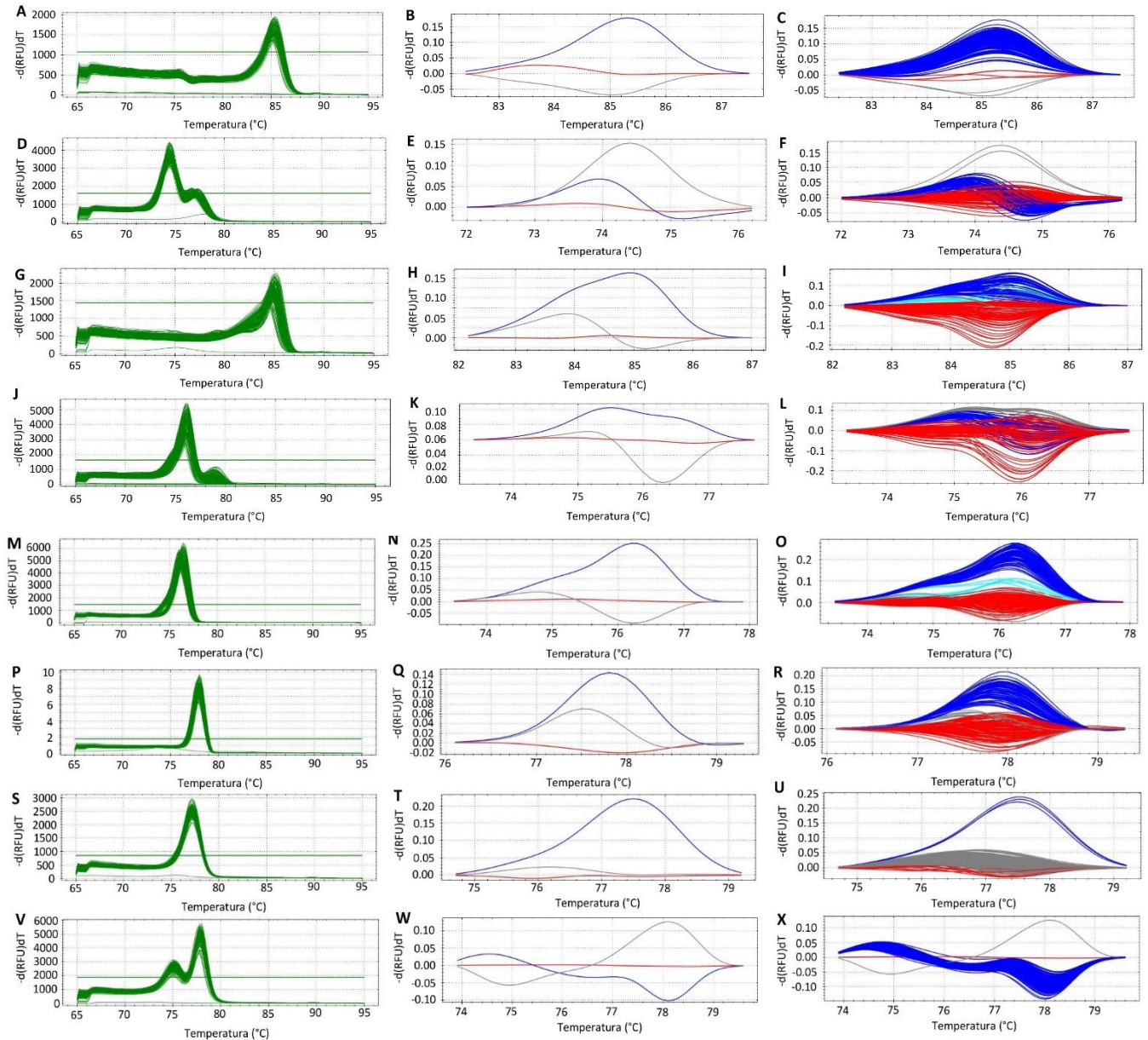
### 5.3.2.2 Identificación molecular de la mutación por medio de HRM

En los análisis por medio de HRM realizados a la población M4 (Figura 1) los marcadores M214 (Figura 25 A-C) y M1586 (Figura 25 S-U) se encuentran en los extremos superior e inferior del mapa de ligamiento del cromosoma 2, respectivamente (Figura 23), y tienen un porcentaje de acierto de plantas con el fenotipo mutado cercano al 50% y del fenotipo no mutado menor al 10%. Esto también ocurre con el marcador P124 (Figura 25 V-X) que es un marcador del cromosoma Y de papaya que se correlaciona con el tamaño de fruta (datos sin publicar).

En el caso de los marcadores con un alto valor LOD, como M766 (Figura 25 D-F), M1161 (Figura 25 G-I), M1482 (Figura 25 J-L), M1481 (Figura 25 M-O) y P142 (Figura 25 P-R) tuvieron un alto porcentaje de acierto con respecto al fenotipo mutado o no mutado. Sin embargo, el marcador M1482, que es el marcador principal del análisis de QTLs, fue el que tuvo el mayor porcentaje de acierto con 96% y 91.3% para el fenotipo mutado y no mutado, respectivamente. Conforme los marcadores se alejan del marcador principal disminuye el porcentaje de acierto (Cuadro 4). La información general del diseño de los imprimadores de los marcadores moleculares se encuentra en el Cuadro 5.

**Cuadro 4.** Porcentajes de aciertos del fenotipo a partir del genotipo obtenido por HRM de una población de 294 plantas de *Carica papaya* obtenidas por un cruce cerrado de plantas hermanas mutantes. \*marcador externo al cromosoma 2 ubicado en el cromosoma X.

Marcador molecular	Porcentaje de aciertos del análisis de HRM	
	Mutadas	No mutadas
M214	5.3	53.4
M766	87.9	79.7
M1161	92.0	84.0
M1482	96	91.3
M1481	89	94
P142	81.5	70.8
M1586	1.3	50.0
P124*	0	48.1



**Figura 25.** Curva derivada de fusión del ADN por medio de qPCR (columna de la izquierda), curva de diferenciación del punto de fusión del ADN de los controles P1 (gris), P2 (azul) y F1 (rojo) (columna central) y de una población de 294 plantas de *Carica papaya* obtenidas por un cruce F3 de plantas hermanas con el fenotipo mutado (columna de la derecha) de los marcadores moleculares M214 (A-C), M766 (D-F), M1161 (G-I), M1482 (J-L), M1481 (M-O), P142 (P-R), M1586 (S-U) y P124 (V-X). Las funciones coloreadas de cian fueron catalogadas en clúster distintos a P1, P2 y F1 por el software *Precision Melt Analysis* de Bio-Rad. d = derivada. RFU = unidades relativas de fluorescencia. T = temperatura (°C).

**Cuadro 5.** Información general del diseño de los marcadores moleculares para la identificación del fenotipo mutado de *Carica papaya*.

Marcador molecular	Imprimador forward de 5' a 3'	Imprimador reverse de 5' a 3'	Tm (°C)	SNP
M214	ATCAAATCTGTACCGTCCGCA	CGAGCCAATTCCATTCCCGT	60	[A/G]
M766	AATTGCTTCTAAGTCATACCCACT	CAAGCAGACGCCTAGAGACA	58	[C/T]
M1161	GTGCAGTTGGTTCGTTGTGAC	GCATCTATCCGTACGCAGGT	60	[A/G]
M1482	CCAGTATTGGAAACGGCTGA	GCGACTCCGATTCTGGTAGA	60	[C/G]
M1481	CGCAAATTATCGTTGTGGTG	AGATCTGCGTCCTGCAAAGT	60	[T/C]
P142	GTTACTACTTTACAGGGAGGGC	AGAGGCCCAATGTAATCCCA	58	[A/C]
M1586	TGAAGCGTTTTTGTGTTTGTCT	AAGTTCTACAAACAGGTAGAGCA	58	[A/G]
P124*	GGTATGGAGATGCGACACAA	ATTCGCGCCTTTGACTCTT	58	[A/C]

### 5.3.3 Búsqueda de genes candidatos responsables del fenotipo mutado

El ensamblaje del genoma de referencia de *C. papaya* se encuentra a nivel de supercontigs con anotaciones limitadas a lo largo de este. Estos supercontigs no se encuentran ordenados. Los marcadores M1160 y M1161 se encontraron en el supercontig 30 que tiene un tamaño de 2.26 Kb. Estos marcadores se ubicaron de 1,132,430 pb a las 1,1372,942 de un exón del transportador 5 de aminoácidos catiónicos (PTHR11785:SF267) y de 1,5997,65 pb a las 1,600,021 pb, sobre el exón de la enzima Alantoato deiminasa (PTHR32494:SF7), respectivamente.

El marcador M1482 se encontró en el supercontig 47 que tiene un tamaño de 7.1 Kb. Se ubicó entre las 837,900 pb a las 837,970 pb de este supercontig, sobre un intrón del transportador GABA 1 (PTHR22950:SF319).

En cuanto al marcador M1481 también se encontró en el supercontig 47 entre las 615,537 y las 615,608 pb. Se ubicó sobre un intrón de la NAD dependiente de epimerasa/dehidratasa (PTHR10366).

En el cromosoma 2 se encontró un gen putativo para *Agamous* en el supercontig 1, el *AGL8-related* (PTHR11945:SF155). Este se encontró entre las 2,394,029 pb a las 2,402,881 pb. Este gen se encontró dentro de un gap, en la secuenciación por GBS, de más de 500,000 pb. El marcador más cercano a este gen es el M111, que tiene un valor LOD de 0.82 y se ubica entre las 4,920,246 pb a las 4,920,758 pb, ósea a aproximadamente 2,500,000 pb del *AGL8-related*.

## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis anatómicos de flores

En 1969 Storey describió por primera vez lo que él tituló como una “anomalía morfológica” en flores de papaya. El fenómeno descrito fue una teoría en donde propuso que las flores unisexuales de papaya provenían de un ancestro bisexual por medio de divergencia intraespecífica. Esto se basó en la observación de los diferentes estadios de carpelodia, en donde desde uno a diez estambres se pueden transformar en carpelos. Cuando los diez estambres se transforman totalmente en carpelos, y se fusionan de forma precisa, la flor adquiere una morfología pistilada (Storey, 1969). Este artículo de Storey fue muy criticado por otros investigadores que argumentan que la hipótesis de Storey no se respalda en los hallazgos microscópicos de la vasculatura de las flores que presentó en su artículo. Además, criticaron la evidencia presentada por Storey ya que cometió errores en la nomenclatura de estructuras microscópicas, por la ontogenia floral presentada y debido a que las fotografías del artículo no tenían la resolución suficiente para respaldar claramente su hipótesis (Ronse, L.P.; Smets, 1999).

Las flores femeninas provenientes de plantas hermafroditas mutadas analizadas en esta investigación tienen su ultraestructura tridimensional idéntica a la de las flores femeninas provenientes de plantas femeninas de fenotipo silvestre (Figura 3 y Figura 9) y microscópicamente también idénticas (Figura 4 y Figura 10). La diferencia estructural entre las flores femeninas de las hermafroditas es la presencia de los filamentos y anteras y sus haces vasculares del androceo en las flores hermafroditas y su ausencia total en las flores femeninas (Ronse, L.P.; Smets, 1999; Ronse De Craene et al., 2011).

Las flores femeninas provenientes de plantas hermafroditas mutadas analizadas tuvieron una ausencia total del androceo y de sus haces vasculares (Figura 3 y Figura 9), los cuales sí se encontraron en las flores hermafroditas provenientes de plantas de fenotipo silvestre (Figura 5 y Figura 6) y en flores estaminadas provenientes de plantas de fenotipo silvestre (Figura 7 y Figura 8). Estos hallazgos indican que es posible el cambio fenotípico de plantas femeninas a partir de plantas hermafroditas de papaya. Por ende, en el pasado evolutivo de la papaya, es posible que de una planta hermafrodita hayan divergido las plantas femeninas. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de Storey.



La carpelodia se sugiere como el fenómeno que impulsa el cambio fenotípico o regresión sexual de plantas hermafroditas a plantas femeninas. Esto se basa en que las flores pentándricas provenientes de plantas hermafroditas silvestres son anatómicamente iguales a las provenientes de plantas hermafroditas mutadas (Figuras 10-13) y en que se encontraron una gran gama de flores intermedias que tienen desde una hasta diez anteras transformadas en carpelos (Figuras 14-16), lo cual concuerda con los diferentes estadios de flores carpelódicas reportados en la literatura (Bogantes Arias & Mora Newcomer, 2017)

## 6.2 Segregación de la mutación

Basado en los resultados de los patrones de segregación obtenidos se pueden analizar las posibilidades que indican los datos. Hay tres escenarios posibles. El primero es que las anomalías encontradas en retrocruces como  $M1 \times P1$  y en cruces como  $M2_a \times M2_b$  y  $M3_d \times M3_e$  indican que el fenotipo mutante observado no sea causado por una mutación genética sino por un cambio epigenético heredable transgeneracional que cambie la expresión en uno o más genes que intervienen en la expresión de los órganos sexuales (Miryeganeh & Saze, 2020).

Se ha sugerido un rol pivotante de las variaciones epigenéticas en la evolución y la ecología de las especies. El estrés ambiental puede alterar la epigenética de un organismo, si las alteraciones se acumulan puede generar un cambio epigenético heredable transgeneracional que altere la expresión de uno o más genes que pueden generar nuevas variedades estables (Miryeganeh & Saze, 2020). Un ejemplo de esto es la paramutación en donde al combinar dos alelos específicos resulta un cambio epigenético heredable transgeneracional que cambia la expresión de uno de los alelos. Se han reportado paramutaciones en *Zea mays* (Poaceae) y en *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) en las que varía el patrón de segregación en la progenie y algunas otras paramutaciones cuya expresión cambia durante el desarrollo de la planta como en *Pisum sativum* (Fabaceae) y en *L. esculentum* (Chandler & Stam, 2004). En el caso de *C. papaya* se ha reportado un cambio posiblemente epigenético que causa hermafroditismo, en donde la proporción de herencia del sexo cambia de 2:1 (hermafroditas:femeninas) a un 95% de plantas hermafroditas. En dónde el 5% restante resultan plantas femeninas que revirtieron el cambio epigenético (Mora-Newcomer & Bogantes-Arias, 2005).

Es posible que el fenotipo observado en papaya en esta investigación, que causa que plantas hermafroditas se transformen fenotípicamente en plantas femeninas sea causado por una paramutación cuyo patrón de segregación varíe en diferentes progenies (Cuadro 1) y cuya expresión cambie durante el desarrollo de la planta (ver apartado de resultados 1 d. Flores hermafroditas mutadas)

El segundo escenario posible es que el fenotipo mutado observado sea causado por una mutación monogénica que se herede de forma dominante. Sin embargo, si bien algunos de los cruces que no se ajustaron al patrón de segregación esperado (Cuadro 1) puede justificarse por que la población analizada era muy pequeña y esto causó que la prueba estadística no definiera bien la segregación a la que se ajustaba. El cruce  $M3_d \times M3_e$  tiene un tamaño lo suficientemente grande como para poder confiar en el resultado de la prueba estadística que demuestra que se ajusta a una segregación 1:1. Además, al tomar en cuenta el resultado del cruce  $M2_c \times M2_d$  que se ajustó a una segregación 1:3 (mutantes:no mutadas) y el resultado del cruce  $M1 \times P1$  en donde no se encontró ninguna planta mutada en la progenie, se sugiere que el fenotipo mutado observado no es causado por una mutación monogénica dominante.

El tercer escenario posible, que explica todos los patrones de segregación encontrados menos el del cruce  $M1 \times P2$  (Cuadro 1), es que la mutación sea causada por una mutación poligénica en dos genes, un gen que debe ser dominante para que se exprese la mutación y otro que debe ser recesivo para que se exprese la mutación. Si bien este escenario es posible, es muy poco probable que surja de forma aleatoria una mutación con estas características. Esto debido a que, se ha estimado que las mutaciones espontaneas ocurren en una de cada 30 millones de pares de bases de forma aleatoria, pueden ocurrir en regiones codificantes o no codificante y pueden ser silenciosas o causar una pérdida o ganancia de función (Lamo et al., 2017; Xue et al., 2009). Estas características hacen que sea muy poco probable que ocurra de forma aleatoria una mutación en dos genes específicos al mismo tiempo. Además, este escenario explica todos los patrones de segregación menos uno. Esto debilita la posibilidad de este escenario.

### **6.3 Uso de marcadores moleculares**

#### **6.3.1 Determinación molecular del sexo**

Según el estudio realizado por Araya-Valverde et al., (2019) establecieron que se puede realizar el sexado molecular de plantas de papaya por medio de qPCR multiplex. Esto se realiza por medio de las amplificaciones de un segmento de ADN que sólo se encuentra en plantas femeninas y un segmento que se encuentra tanto en plantas femeninas como en hermafroditas. Obteniendo como resultado que la función de la curva de amplificación de las plantas femeninas presenta un solo pico, mientras que la de las plantas hermafroditas poseen dos picos. Este mismo resultado fue el que se obtuvo en esta investigación (Figura 18), por lo que se puede afirmar que el sexado molecular de las plantas de papaya realizado se hizo de forma correcta.

La proporción de 1:2 (femeninos:hermafroditas) es la esperada en cruces cuyos parentales son una planta femenina y una hermafrodita (Araya-Valverde et al., 2019; Chen et al., 2019; Jiménez et al., 2014; Urasaki et al., 2002). Los resultados del sexado molecular de esta investigación se ajustan a esta proporción esperada (Cuadro 2).

#### **6.3.2 Caracterización molecular de la mutación de regresión sexual**

##### **6.3.2.1 Identificación de marcadores moleculares por medio de tGBS**

El cromosoma 1 de la papaya es el cromosoma sexual, puede ser XX en el caso de las plantas femeninas, XY en el caso de las plantas macho y XY<sup>h</sup> en el caso de las plantas hermafroditas. Los cromosomas del 2 al 9 son autosomas (Chen et al., 2019; Jiménez et al., 2014; Pedro et al., 2009; VanBuren et al., 2015). En el cromosoma 2 de la papaya fue en donde se encontraron marcadores moleculares que se correlacionaron de forma significativa con el fenotipo mutado de la papaya (Figura 19 y Figura 21). Si la correlación encontrada de estos marcadores es causal significaría que el fenotipo observado es causado por una mutación ubicada en el cromosoma 2. Esto implica que este autosoma puede determinar o cambiar el fenotipo sexual de las plantas hermafroditas de papaya.

La depuración de los marcadores repetidos, invertidos o con poca información se realizó de forma correcta (Figura 20), dejando únicamente marcadores moleculares que tienen un valor LOD menor a 1 y una fracción de recombinación menor a 0.5 así como reportó el protocolo

de Broman (2012). Los marcadores homocigotos para la mutación se encontraron, como es de esperar, en las plantas con el fenotipo mutado y marcadores heterocigotas en las plantas con el fenotipo no mutado. La presencia de fragmentos sin información, que se observan como espacios en blanco (Figura 22), son inherentes al mapeo de QTLs debido a la secuenciación fragmentada del genoma (Moore *et al.* 2003, Arler 2007, Ueno *et al.* 2015).

El cromosoma 2 de 120 cM (Figura 21 A) es más grande que los grupos de ligamiento que corresponden al cromosoma 2 obtenidos por Blas *et al.* (2012) y por Nantawan *et al.* (2019). El tamaño de los grupos de ligamiento puede variar de acuerdo con la función de mapeo que se utilice durante el análisis de datos y con la densidad de marcadores que forman parte del grupo de ligamiento (K. Broman, 2012). Blas *et al.* (2012) y Nantawan *et al.* (2019) obtuvieron grupos de ligamiento con una densidad de marcadores moleculares menor a la obtenida en esta investigación, por lo que puede que esta sea la causa de la diferencia en los tamaños del cromosoma.

El marcador M1482 fue el marcador principal, que se encuentra ubicado en los 40.7 cM del grupo de ligamiento 2. Al ser el marcador principal, posee el valor LOD más alto. Los otros marcadores moleculares que correlacionan de forma significativa para el fenotipo mutado tienen un valor de LOD menor al M1482. Conforme disminuye el valor LOD de los marcadores moleculares también disminuye la capacidad que estos tienen para poder determinar el genotipo correcto de un individuo (Cuadro 3 y Figura 23 B-E). Este mismo comportamiento lo reportó Broman (2012) y Nantawan *et al.*, (2019).

Por ejemplo, con el genotipo H se encontraron pocos ( $n = 1$  ó  $2$ ) individuos heterocigotos mutantes (Figura 23 B-E) que se ubicaban a 1.0 unidades relativas de fenotipo, que es el nivel donde se hallaron los individuos homocigotos recesivos, en todos los marcadores moleculares que poseían un valor de LOD mayor a 2.5. El M1482 presentó solamente un individuo heterocigoto mutante que se encontró a 1.0 unidades relativas de fenotipo. Conforme disminuye el valor LOD de los marcadores aumenta el número de individuos heterocigotos mutantes que se encuentran a 1.0 unidades relativas de fenotipo. Esto indica que existe una baja probabilidad que, al emplear este marcador, se clasifique a un heterocigoto mutante como un homocigoto recesivo para la mutación. Esto se puede comprobar con estudios posteriores en los que se empleen estos marcadores moleculares para

el genotipado de cruces controlados que tengan individuos mutantes y no mutantes (Kalivas *et al.* 2014, Didehdar *et al.* 2016, Ganopoulos *et al.* 2012, Shin *et al.* 2019). El genotipado incorrecto también puede significar que ocurrió la recombinación entre la región que contiene la mutación y el marcador, y se rompió la asociación entre ambos.

El hecho de que los marcadores que están ligados tuvieran una recombinación muy baja (Figura 24 B) y un valor LOD alto indica la robustez de los marcadores que forman parte del análisis (Velmurugan *et al.* 2018). El locus del gen mutado se encuentra cercano a los 40.72 cM del cromosoma 2, probablemente entre los 33.78 cM y los 42.81 cM. No es posible afirmar que el locus se encuentra dentro de este marcador necesariamente debido a que, como se explicó en el párrafo anterior, el marcador clasificó a un individuo H como B.

Así como Blas *et al.* (2012) y Nantawan *et al.* (2019) encontraron QTLs que se correlacionaban con diferentes características del fruto de la papaya como dulzura, tamaño y peso que sirvieran como base en el mejoramiento genético dirigido de estas características para variedades específicas de papaya, los marcadores moleculares encontrados en esta investigación se pueden emplear para la identificación a nivel molecular individuos con el fenotipo mutado y silvestre con un alto porcentaje de acierto.

### **6.3.2.2 Identificación molecular de la mutación por medio de HRM**

Como se explicó en la sección anterior los marcadores moleculares que se correlacionaron de forma significativa con el fenotipo mutado, se pueden emplear para realizar la identificación molecular de individuos mutantes y no mutantes con alto porcentaje de acierto que varía dependiendo de cada caso en específico. Esto se comprobó al realizar el genotipado del cruce  $M3_d \times M3_e$  (Figura 17) en donde se observó que, al comparar el genotipado molecular con el fenotipo observado, de marcadores con un valor LOD bajo, como el M214, no coincide la mayoría de los resultados (Figura 25 A-C y Cuadro 4). En este caso, los casos en que hay una concordancia entre el genotipo y el fenotipo están cercanos al 50% de ciertos que corresponde a un acierto aleatorio. Mientras que en el caso de los marcadores con un valor LOD significativo, como el M1481 y el M1482, los resultados del genotipado molecular sí coincide, en su mayoría, con la observación fenotípica (Figura 25 y Cuadro 4). Es importante mencionar que la variabilidad en la función de cada muestra (Figura 25) que se encuentra dentro de un mismo clúster puede deberse a variaciones humanas en algún punto

del proceso desde la toma de la muestra de tejido, el proceso de extracción de ADN, su cuantificación y dilución, que causen variaciones que pueden provocar cambios en las curvas mostradas en el análisis de HRM.

Se encontró una concordancia entre el marcador molecular con el valor LOD más alto, el M1482, con el marcador que mejor logró diferenciar genotípicamente, por medio de HRM, de forma correcta las plantas mutadas de las de fenotipo silvestre. Esta misma lógica se ha seguido en diferentes estudios en donde encuentran características de interés agronómico que están correlacionadas con un polimorfismo. El cual se puede usar para desarrollar marcadores moleculares para realizar la identificación de las plantas que presentan dicha característica. Esto se ha realizado para especies como el maíz (Veldboom et al., 1994) y en trigo (Sourdille et al., 2003).

Estos hallazgos indican que sí hay cambios a nivel de la secuencia de ADN que causan que plantas hermafroditas de papaya produzcan frutos femeninos. Sin embargo, como se discutió en la sección VII. 2. Segregación de la mutación, este cambio parece que no segrega siguiendo un patrón mendeliano. Por lo que surge la interrogante ¿El fenotipo de regresión sexual de hermafrodita a femenino es causado por una mutación o por un cambio epigenético heredable? Basado en los resultados obtenidos, ambas opciones son posibles. El patrón de segregación apoya más a que sea un cambio epigenético transgeneracional y la identificación de la mutación por medio de HRM apoya a que es una mutación genética.

Ya sea que el fenotipo de regresión sexual observado sea causado por una mutación o por un cambio epigenético transgeneracional, el hecho es que es posible el cambio fenotípico de una planta hermafrodita en una planta femenina. Y esto tiene implicaciones de importancia para entender la evolución sexual de la papaya y de los angiospermas. Para esto se requiere analizar lo que se conoce sobre el pasado evolutivo de la papaya y el estado actual de la especie y de los angiospermas.

Actualmente la mayor cantidad de plantas en la naturaleza son angiospermas hermafroditas. El sistema de determinación de órganos sexuales ABCE se ha comprobado que funciona en varias de las plantas monoicas más estudiadas. Se ha demostrado que este sistema, funciona bastante bien para plantas monoicas, pero rara vez funciona para determinar el sexo de organismos dioicos. Esto se atribuye a que los organismos dioicos, al encontrarse separados

los machos de las hembras, pueden divergir a lo largo de su historia evolutiva de forma separada, desarrollando así características, incluyendo las que determinan el sexo, que divergen entre ellos y de las especies monoicas (Pannell, 2017).

El escenario más plausible para la evolución de los organismos dioicos es a partir de los monoicos. Esto debido a que los monoicos pueden adquirir mecanismos que causen una selección positiva de mutaciones que causen la esterilidad masculina o femenina de las flores monoicas. Debido a la dificultad de diseminación de las mutaciones de esterilidad femenina en poblaciones parcialmente fecundadas y para disminuir las probabilidades de auto fecundación es que se predice que las mutaciones de esterilidad masculina son las que tienen mayores probabilidades de heredarse y seleccionarse por especialización sexual en poblaciones primeramente ginodioicas y posteriormente dioicas propiamente dichas (Pannell, 2017).

En el caso de la papaya, en la actualidad las plantas hermafroditas únicamente se encuentran en plantaciones agrícolas (Chen et al., 2019). En la naturaleza sólo se encuentran plantas dioicas (VanBuren et al., 2015). En esta investigación se demostró que es posible la regresión sexual de plantas hermafroditas a plantas femeninas. Existen dos posibilidades acerca de la evolución de la papaya. Una de ellas es que el ancestro original de la papaya fuera hermafrodita, así como se presentaría en el escenario más aceptado para la evolución sexual de los angiospermas monoicos (Pannell, 2017), y que este haya sufrido de mutaciones de selección positiva de mutaciones que causaron la esterilidad masculina o femenina, y estas mutaciones hayan sido favorables para la progenie, que generaran individuos más aptos para adaptarse a su entorno y, por selección natural, estas mutaciones fueron heredadas y fijadas en el genoma de la progenie. Esto apoyaría la hipótesis de Storey (1969). La otra posibilidad es que el ancestro original de la papaya fuera dioico, y que las papayas ginodioicas surgieran por selección artificial producto de la domesticación humana, así como lo hipotetiza Vanburen et al. (2015).

En términos evolutivos la familia Caricaceae divirgió de su ancestro más cercano aproximadamente hace 25 millones de años (Antunes Carvalho, 2014; Aryal & Ming, 2014). El cromosoma X divirgió del cromosoma Y hace aproximadamente 7 millones de años (Wang et al., 2012). Esto sugiere que el origen de esta divergencia fue, probablemente, a

partir de un organismo hermafrodita del cual surgió una población de papayas femeninas. En cuanto a la población hermafrodita que dio origen a la población femenina, de forma especulativa, puede que se haya mantenido conviviendo con las femeninas o puede que haya desaparecido y dado origen a una población de machos. Lo cierto es que, en este punto se requiere, necesariamente, una población hermafrodita, de machos, o ambas que polinicen a las femeninas.

Según el estudio de Yu et al. (2008) se sugiere que el cromosoma de los hermafroditas y de los machos divergieron aproximadamente hace 73.000 años de un cromosoma Y ancestral en común. Esto sugiere que es poco probable que el cromosoma  $Y^h$  de las plantas hermafroditas haya surgido por la selección del ser humano, debido a que el génesis de la agricultura en Mesoamérica se estima haber ocurrido aproximadamente hace 6.200 años (Scales et al., 2001).

Sin embargo, Vanburen et al., (2015) por medio de análisis genómicos de diferentes poblaciones de papaya machos, incluyendo la línea AU9 que usó Yu et al. (2008), encontró diferentes haplotipos del cromosoma Y. Los resultados de la línea AU9 sugiere la divergencia de los cromosomas Y y  $Y^h$  hace 66.000 años, lo que coincide con los resultados de Yu et al. (2008). Pero el haplotipo MSY2 divergió hace 36.000 años, el MSY1 hace 29.000 años y el MSY3, que es el haplotipo que está relacionado con el cromosoma  $Y^h$ , divergió hace 4.000 años. Esta fecha coincide con el auge de la cultura maya y con las domesticaciones agrícolas realizadas por ellos. Lo que indica que es muy probable que la papaya hermafrodita que existe en la actualidad fue seleccionada por los Mayas y se haya mantenido hasta nuestros días (Colunga-garcamarin & Zizumbo-villarreal, 2004; Vanburen et al., 2015).

Si bien la papaya hermafrodita que existe en la actualidad probablemente fue domesticada por los Mayas, surge la pregunta: ¿Es posible que la población de papaya existió aproximadamente hace 25 o hace 7 millones de años fuera hermafrodita? Basado en la información disponible hasta el momento se puede responder que sí, es posible, y tendría mucho sentido que fuera un hermafrodita el que dio origen a la divergencia del cromosoma X y el Y. Este hermafrodita ancestral, probablemente, fue un organismo más robusto que los hermafroditas actuales, menos susceptible a cambios ambientales, y en cierto punto de la evolución fue desplazado por poblaciones monoicas, que estaban mejor adaptadas a su



entorno. Estas poblaciones monoicas mantuvieron silenciados los genes que expresan el sexo hermafrodita por miles de años y por medio de la selección artificial de los mayas, hace aproximadamente 4.000 años, lograron obtener una línea de papaya con los genes de el hermafroditismo activos, lo cual les resultó de interés agrícola.

### 6.3.2.3 Búsqueda de genes candidatos responsables del fenotipo mutado

El genoma de referencia que se encuentra disponible en Phytozome se encuentra ensamblado a nivel de supercontig. Los cuales se encuentran en desorden y tienen pocas anotaciones. Esto complica la ubicación consecutiva de una región específica. En el caso de los marcadores más significativos encontrados en este trabajo (Cuadro 3), el M1161 se ubicó en el supercontig 30 y M1482 y M1481 en el supercontig 47. Sólo estos dos supercontigs tienen un tamaño sumado de 8.36 Kb, que es una región muy grande que puede tener cientos o miles de genes.

El marcador M1160 se encontró dentro de un exón del transportador 5 de aminoácidos. Este transportador transmembrana es capaz de permitir el ingreso del L-glutamato y de la L-Lisina en *Arabidopsis* (Su et al., 2004). Este gen hasta el momento no se ha correlacionado con el desarrollo floral.

En el caso del M1161 se ubicó dentro de un exón de la enzima Alantoato deiminasa. Esta se ha reportado en *Arabidopsis* como parte del catabolismo de purinas que produce como producto final amonio (Todd & Polacco, 2006; Werner et al., 2008, 2013). No se ha relacionado con el desarrollo floral en ninguna especie.

En cuanto el M1482 se ubicó en el intrón del gen *GABA TRANSPORTER 1*, el rol de GABA y sus transportadores transmembrana en plantas se encontraron en la última década y su función en plantas se encuentra aún en investigación. Se ha propuesto que intervienen como una señal que modula el crecimiento, el desarrollo y las respuestas ante estrés biótico y abiótico en plantas por medio de la regulación del flujo de aniones (Ramesh et al., 2017). No hay reportes en la literatura que correlacione este gen con el desarrollo floral, pero sí se ha encontrado transportadores GABA en flores de *Arabidopsis*.

Em M1181 que se ubicó en un intrón del gen *NAD dependiente de epimerasa/dehidratasa*, interviene en procesos de oxidación-reducción que en *Arabidopsis* se ha correlacionado con

procesos de desarrollo en la semilla (Ramesh et al., 2017). No se encontraron reportes de que intervenga en el desarrollo floral.

La identidad de los órganos florales es determinada por un control genético específico, cuyos genes pueden ser genes candidatos que expliquen el fenotipo mutado estudiado en este trabajo. El meristemo floral se diferencia en los primordios de los órganos que van a dar origen a los sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Ferrario et al., 2004; Gómez-Mena et al., 2005; Zik & Irish, 2003). La transformación de órganos estructurales en otros suele estar relacionados a genes homeóticos que suelen formar parte del modelo ABCE o en genes que intervienen en rutas de reguladores de crecimiento necesarias para el desarrollo floral, principalmente, de los organismos monoicos (Krizek & Fletcher, 2005; Robles & Pelaz, 2005; Theißen et al., 2016; Theißen & Becker, 2004). De las cinco clases de genes florales homeóticos que determinan la identidad de los órganos florales, para esta investigación, son de mayor relevancia la clase B que incluye a los genes *AP3* y *PI*, la clase C que incluye a *AG* y la clase E que incluye a los genes *SEP3*, *SEP2* y *SEP1* (Coen & Mayerowitz, 1991; Honma & Goto, 2000; Schwarz-Sommer et al., 1990). Como la identidad de los estambres es determinada por B + C + E y la de los carpelos por C + E, es posible que si en los estambres se silencian los genes de la clase B (*AP3* y *PI*) se transformen en carpelos (Theißen et al., 2016; Theißen & Saedler, 2001).

En el caso de esta investigación, los dos órganos que intervienen en el fenotipo mutado son los estambres y los carpelos. Para que se desarrollen los estambres se tienen que expresar los genes *ag*, *ap3*, *pi* y *sep1*, *sep2* o *sep3*. En el caso de los carpelos se requiere que se expresen los genes *ag* y *sep* (Honma & Goto, 2000; Pelaz et al., 2000; Sablowski, 2015). Si hay un cambio de expresión en alguno de estos genes homeóticos se puede dar la no formación o el cambio de identidad de estos órganos. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se reportó que la mutación en el gen *ap3* que causa la transformación de estambres en carpelos, con un rango de flores intermedias que variaba dependiendo de la temperatura a las que se le sometió (Dennis & Peacock, 2019); este efecto también se reportó por la mutación en el gen *pi-3* (Bowman et al., 1991; Myakushina et al., 2009). El gen *undeveloped anther* se reportó en *A. thaliana*, causa que las anteras no se desarrollen, únicamente el filamento se desarrolla (Sanders et al., 1999).

*SUPERMAN* (*SUP*) se expresa en el meristemo floral, interviene en el remplazo de los carpelos por estructuras quiméricas que fusionan los carpelos con los estambres. Este gen resulta de gran interés en el estudio de la carpelodia, y de la mutación que se pretende estudiar, ya que en la carpelodia se da la transformación y fusión de los filamentos de las anteras, e incluso de las anteras, en carpelos (Ronse De Craene et al., 2011).

Se ha reportado la importancia de ciertos reguladores de crecimiento como el ácido jasmónico durante el correcto desarrollo de las anteras (Acosta & Przybyl, 2019). También se ha demostrado que la mutación en los genes *pin-3*, *pin-4*, o el doble mutante de *pin3-5pin7-1*, que son genes que intervienen en el transporte de auxinas, producen flores sin estambres en *Arabidopsis* (Cardarelli & Cecchetti, 2014) y el gen *PINOID*, que también interviene en el transporte polar de auxinas, si se muta puede producir flores con pocos o ningún estambre (Bennett et al., 1995).

De todos estos genes, el único que se encontró ubicado en el cromosoma 2 de la papaya fue un gen putativo para *AGAMOUS*, llamado AGL8-related. En caso de que efectivamente este gen codifique para *AG* y tenga un cambio en su secuencia que cambie su expresión o la función de su producto, puede ser el causante del fenotipo mutado estudiado. También, puede que existan otras de estos genes en el cromosoma dos de la papaya, pero que no se encuentran anotados en el genoma de referencia.

Este trabajo no permite llegar a la resolución de un solo gen, por tanto, sería interesante realizar estudios del transcriptoma y del metiloma para identificar el gen causal del fenotipo observado estudiado. Esto debido a que el QTL encontrado en el cromosoma 2 de la papaya que está correlacionado con la mutación está formado por una sección del cromosoma que puede contener cientos de genes.

Además, como el fenotipo mutado estudiando en esta investigación parece estar relacionado con la carpelodia (Figuras 10-14), la identificación del gen o los genes causantes de este fenotipo pueden ayudar a identificar genes relacionados con la carpelodia. Al identificar estos genes se podrían seleccionar variedades con poca o ninguna expresión en estos genes para obtener líneas con carpelodia disminuida o ausente.

## 7 Conclusiones

- a. Las flores femeninas provenientes de plantas hermafroditas mutadas son macro y microscópicamente iguales a las flores femeninas provenientes de plantas femeninas de fenotipo silvestre.
- b. El fenotipo mutado estudiado no segrega de forma mendeliana monogénica ni poligénica. Es posible que la causa se base en un cambio epigenético transgeneracional.
- c. En el caso de que el fenotipo mutante sea causado por una mutación genética la misma, probablemente, se encuentra cercano a los 40.72 cM del cromosoma 2, entre los 33.78 cM y los 42.81 cM.
- d. Es posible el cambio fenotípico de una planta hermafrodita en una planta femenina. Por lo que, es posible, que el ancestro original de la papaya haya sido monoico.
- e. Algunos genes candidatos encontrados fueron: *AGL8-related*, el *transportador GABA 1*, *transportador 5 de aminoácidos* y el *NAD dependiente de epimerasa/dehidratasa*.

## 8 REFERENCIAS

- Abreu, I. S., Carvalho, C. R., & Soares, F. A. F. (2015). Early sex discrimination in *Carica papaya* by nuclei FISH. *Euphytica*, 206(3). <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1485-1>
- Acosta, I. F., & Przybyl, M. (2019). Jasmonate signaling during *Arabidopsis* stamen maturation. *Plant and Cell Physiology*, 60(12), 2648–2659. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz201>
- Ainsworth, C. (2000). Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany*, 86(2), 211–221. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1201>
- Antunes Carvalho, F. (2014). *Molecular Phylogeny, Biogeography and an e-Monograph of the Papaya Family (Caricaceae) as an Example of Taxonomy in the Electronic Age*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-10267-8>
- Antunes Carvalho, F., & Renner, S. S. (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 46–53. [https://doi.org/10.1007/978-3-658-10267-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-658-10267-8_4)
- Araya-Valverde, E., Bogantes, A., Holst, A., Vargas-Mora, C., Gómez-Alpízar, L., Brenes, A., Sánchez-Barrantes, E., Chavarría, M., & Barboza-Barquero, 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/10.1590/198470332019v19n4a59>
- Arends, D., Prins, P., Jansen, R. C., & Broman, K. W. (2010). R/qtl: High-throughput multiple QTL mapping. *Bioinformatics*, 26(23), 2990–2992. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq565>
- Arler, T. H. E. M. (2007). *Carica Papaya* (Caricaceae ): a case study into the effects of growth and reproduction. *Methods*, 94(6), 999–1002.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species nuclear DNA content material and methods. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218. <https://doi.org/10.1007/BF02672016>

- Aryal, R., Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Yu, Q., Sunkar, R., & Ming, R. (2014). Sex specific expression and distribution of small RNAs in papaya. *BMC Genomics*, *15*, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-20>
- Aryal, R., & Ming, R. (2014). Sex determination in flowering plants: Papaya as a model system. *Plant Science*, *217–218*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.10.018>
- Badillo, V. M. (1971). *Monografía de la familia Caricaceae*. (Asociación de profesores (ed.); 2nd ed.). Asociación de profesores. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, *3*(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Barker, M. S., Vogel, H., & Schranz, M. E. (2009). Paleopolyploidy in the Brassicales: analyses of the cleome transcriptome elucidate the history of genome duplications in *Arabidopsis* and other Brassicales. *Genome Biology and Evolution*, *1*, 391–399. <https://doi.org/10.1093/gbe/evp040>
- Benavides-Acevedo, M., & Bolaños-Villegas, P. (2021). Embryo development in *Carica papaya* Linn. *BioRxiv*, 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.03.11.434975>
- Bennett, S. R. M., Alvarez, J., Bossinger, G., & Smyth, D. R. (1995). Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *8*(4), 505–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040505.x>
- Blas, A. L., Yu, Q., Veatch, O. J., Paull, R. E., Moore, P. H., & Ming, R. (2012). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. *Molecular Breeding*, *29*(2), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9562-1>
- Bogantes, A., & Mora, E. (2017). Influencia del genotipo y la temperatura sobre la carpelodia en papaya. *Agronomía Mesoamericana*, *28*(3), 577. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27892>
- Bogantes Arias, A., & Mora Newcomer, E. (2017). Influencia del genotipo y la temperatura

- sobre la carpelodia en papaya. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 577.  
<https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27892>
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., & Meyerowitz, E. M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, 112(1), 1–20.
- Broman, K. (2012). *Genetic map construction with R / qtl* (pp. 1–41). University of Wisconsin-Madison Department of Biostatistics & Medical Informatics Technical Report # 214. <http://www.rqtl.org>
- Broman, K., & Sen, S. (2009). *A guide to QTL mapping with R/qtl* (1st ed.). Springer.
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., & Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7), 889–890.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>
- Buesa, R. J. (2007). Microwave-assisted tissue processing: real impact on the histology workflow. *Annals of Diagnostic Pathology*, 11(3), 206–211.  
<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2007.02.006>
- Cardarelli, M., & Cecchetti, V. (2014). Auxin polar transport in stamen formation and development: How many actors? *Frontiers in Plant Science*, 5(JUL), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00333>
- Carvalho, F., & Renner, S. (2014). The phylogeny of Caricaceae. In M. R. & P. H. Moore (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya* (Issue June 2015, pp. 1–438). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7>
- Chan-Tai, C., Yen, C. R., Chang, L. S., Hsiao, C. H., & Ko, T. S. (2003). All hermaphrodite progeny are derived by self-pollinating the sunrise papaya mutant. *Plant Breeding*, 122(5), 431–434. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00812.x>
- Chandler, V. L., & Stam, M. (2004). Chromatin conversations: Mechanisms and implications of paramutation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 532–544.  
<https://doi.org/10.1038/nrg1378>
- Charlesworth, D. (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*, 88, 94–

101. <https://doi.org/10.1038/sj/hdy/6800016>

Chaves-Bedoya, G., & Nuñez, V. (2007). A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica*, 153(1–2), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9256-7>

Chávez-Pesqueira, M., & Núñez-Farfán, J. (2017). Domestication and genetics of papaya: A review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5(DEC), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00155>

Chávez-Pesqueira, M., Suárez-Montes, P., Castillo, G., & Núñez-Farfán, J. (2014). Habitat fragmentation threatens wild populations of *Carica papaya* (Caricaceae) in a lowland rainforest. *American Journal of Botany*, 101(7), 1092–1101. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400051>

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(1). <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0918-7>

Coen, E. S., & Mayerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(5), 31–38.

Colunga-garcamarin, P., & Zizumbo-villarreal, D. (2004). Domestication of plants in Maya Lowlands. *Economic Botany*, 58(Supplement), 101–110.

Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rubio-Somoza, I., & Baena-González, E. (2013). miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 4(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00197>

Corbesier, L., C., V., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G., G., & Ft. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316(May), 1030–1033.

Delph, L. F. (2003). Sexual dimorphism in gender plasticity and its consequences for breeding system evolution. *Evolution and Development*, 5(1), 34–39.



<https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03006.x>

- Delph, L. F. (2009). Sex Allocation: Evolution to and from Dioecy. *Current Biology*, *19*(6), R249–R251. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.048>
- Dennis, L., & Peacock, J. (2019). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *31*(6), 1192–1193. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00276>
- Depeursinge, A., Racoceanu, D., Iavindrasana, J., Cohen, G., Platon, A., Poletti, P.-A., & Muller, H. (2010). Fusing Visual and Clinical Information for Lung Tissue Classification in HRCT Data. *Artificial Intelligence in Medicine*, *14*, 1118. <https://doi.org/10.1016/j>
- Deputy, J. C., Ming, R., Ma, H., Liu, Z., Fitch, M. M. M., Wang, M., Manshardt, R., & Stiles, J. I. (2002). Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *106*(1), 107–111. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0995-0>
- Didehdar, M., Khansarinejad, B., Amirrajab, N., & Shokohi, T. (2016). Development of a high-resolution melting analysis assay for rapid and high-throughput identification of clinically important dermatophyte species. *Mycoses*, *59*(7), 442–449. <https://doi.org/10.1111/myc.12492>
- Eguiarte, L. E., Castillo, A., & Sousa, V. (2003). Evolución molecular y genómica en angiospermas. *Interciencia*, *28*(3), 141–147.
- Ferrario, S., Immink, R. G. H., & Angenent, G. C. (2004). Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.11.003>
- Fisher, J. (1980). The vegetative and reproductive structure of papaya (*Carica papaya*). *Lyonia*, *1*(4), 191–211.
- Freeman, D. C., Harper, K. T., & Charnov, E. L. (1980). Sex change in plants: Old and new observations and new hypotheses. *Oecologia*, *47*(2), 222–232. <https://doi.org/10.1007/BF00346825>

- Frohlich, M. W., & Parker, D. S. (2000). The Mostly Male Theory of Flower Evolutionary Origins: From Genes to Fossils. *Systematic Botany*, 25(2), 155. <https://doi.org/10.2307/2666635>
- Ganopoulos, I., Madesis, P., Zambounis, A., & Tsaftaris, A. (2012). High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum* formae speciales complex. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1), 16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02610.x>
- García, R. (1993). *Laboratorio de Anatomía Patológica*. Interamericana McGraw Hill.
- Gómez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M. M. R., Angenent, G. C., & Sablowski, R. (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development*, 132(3), 429–438. <https://doi.org/10.1242/dev.01600>
- Goodhew, P. J., Humphreys, J., & Beanland, R. (2001). *Electron microscopy and analysis*. Taylor & Francis.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 1178–1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Hanzawa, Y., Money, T., & Bradley, D. (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), 7748–7753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500932102>
- Honma, T., & Goto, K. (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development*, 127(10), 2021–2030.
- Hsu, T.-H., Gwo, J.-C., & Lin, K.-H. (2012). Rapid sex identification of papaya (*Carica papaya*) using multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP). *Planta*, 236(4), 1239–1246. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1681-3>
- Irish, V. F. (2010). The flowering of *Arabidopsis* flower development. *Plant Journal*, 61(6),

1014–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04065.x>

Jiménez, V., Mora-Newcomer, E., & Gutiérrez-Soto, M. (2014). Biology of the papaya plant. In *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 1–438). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7>

Kalivas, A., Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Chatzopoulou, P., Tsaftaris, A., & Madesis, P. (2014). DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. *Molecular Biology Reports*, *41*(8), 5147–5155. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3381-5>

Karunakaran, G., Ravishankar, H., & Dinesh, M. R. (2010). Genetical studies in papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, *851*, 103–108. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.851.13>

Kaufmann, K., Muiño, J. M., Jauregui, R., Airoidi, C. A., Smaczniak, C., Krajewski, P., & Angenent, G. C. (2009). Target genes of the MADS transcription factor *sepallata3*: Integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower. *PLoS Biology*, *7*(4), 0854–0875. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000090>

Kempin, S. A., Savidge, B., & Yanofsky, M. F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*, *267*(5197), 522–525. <https://doi.org/10.1126/science.7824951>

Khan, S., Tyagi, A. P., & Jokhan, A. (2002). Sex ratio in Hawaiian papaya (*Carica papaya* L.) variety “Solo.” *J. Nat. Sci.*, *20*, 22–24.

Kim, M. S., Moore, P. H., Zee, F., Fitch, M. M. M., Steiger, D. L., Manshardt, R. M., Paull, R. E., Drew, R. A., Sekioka, T., & Ming, R. (2002). Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, *45*(3), 503–512. <https://doi.org/10.1139/g02-012>

Korpelainen, H. (1998). Labile sex expression in plants. *Biol. Rev.*, *77*(1), 157–180.

Krizek, B. A., & Fletcher, J. C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, *6*(9), 688–698. <https://doi.org/10.1038/nrg1675>

- Lamo, K., Ji Bhat, D., Kour, K., & Singh Solanki, S. P. (2017). Mutation Studies in Fruit Crops: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 3620–3633. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.418>
- 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), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194605>
- Leong, A. S. Y. (2004). Microwaves and turnaround times in histoprocessing: Is this a new era in histotechnology? *American Journal of Clinical Pathology*, 121(4), 460–462. <https://doi.org/10.1309/PLQ523DENNH8R00Q>
- Li, X., Zhu, X., Mao, J., Zou, Y., Fu, D., Chen, W., & Lu, W. (2013). Isolation and characterization of ethylene response factor family genes during development, ethylene regulation and stress treatments in papaya fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.020>
- Liang, Y., Liu, H.-J., Yan, J., & Tian, F. (2021). Natural Variation in Crops: Realized Understanding, Continuing Promise. *Annual Review of Plant Biology*, 72(1), 357–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-080720-090632>
- Liljegren, S. J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell*, 11(6), 1007–1018. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1007>
- Lillie, R. (1977). *Biological Stains*. (9th ed.). The Williams y Wilking Company.
- 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(6972), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature02228>
- Liu, Z., Shi, L., Liu, Y., Tang, Q., Shen, L., Yang, S., Cai, J., Yu, H., Wang, R., Wen, J., Lin, Y., Hu, J., Liu, C., Zhang, Y., Mou, S., & He, S. (2015). Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of mitogen-activated protein kinase and

- mitogen-activated protein kinase kinase genes in *Capsicum annuum*. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00780>
- Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal*, 79(4), 544–567. <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>
- Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J., Alam, M., Ming, R., Tang, H., Wang, X., Bowers, J., Paterson, A., Lisch, D., & Freeling, M. (2008). Finding and comparing syntenic regions among *Arabidopsis* and the outgroups papaya, poplar, and grape: CoGe with rosids. *Plant Physiology*, 148(4), 1772–1781. <https://doi.org/10.1104/pp.108.124867>
- Meyerowitz, E. M., Smyth, D. R., & Bowman, J. L. (1989). Abnormal flowers and pattern formation in floral development. *Development*, 106(2), 209–217.
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., Senin, P., Wang, W., Ly, B. V., Lewis, K. L. T., Salzberg, S. L., Feng, L., Jones, M. R., Skelton, R. L., Murray, J. E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., ... Alam, M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190), 991–996. <https://doi.org/10.1038/nature06856>
- Ming, R., Yu, Q., & Moore, P. H. (2007). Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18(3), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.11.013>
- Miryeganeh, M., & Saze, H. (2020). Epigenetic inheritance and plant evolution. *Population Ecology*, 62(1), 17–27. <https://doi.org/10.1002/1438-390X.12018>
- Moore, P. H., Albert, H. H., & Borthakur, D. (2003). *Molecular characterization of the sex determination locus in Carica papaya L.*
- Mora-Newcomer, E., & Bogantes-Arias, A. (2005). Estudio de una mutación en papaya (*Carica papaya* L.) que produce letalidad de plantas femeninas. *Agronomía Mesoamericana*, 16(1), 89–95. <https://doi.org/10.15517/am.v16i1.5185>
- Myakushina, Y. A., Milyaeva, E. L., Romanov, G. A., & Nikiforova, V. Y. (2009). Mutation in LSU4 gene affects flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 428(1), 257–260. <https://doi.org/10.1134/S1607672909050093>

- Nantawan, U., Kanchana-Udomkan, C., Bar, I., & Ford, R. (2019). Linkage mapping and quantitative trait loci analysis of sweetness and other fruit quality traits in papaya. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2043-0>
- Niklas, K. J., & Marler, T. E. (2007). *Carica papaya* (Caricaceae): A case study into the effects of domestication on plant vegetative growth and reproduction. *American Journal of Botany*, *94*(6), 999–1002. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.6.999>
- Ott, A., Liu, S., Schnable, J. C., Yeh, C. T., Wang, K. S., & Schnable, P. S. (2017). tGBS® genotyping-by-sequencing enables reliable genotyping of heterozygous loci. *Nucleic Acids Research*, *45*(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx853>
- Oury, V., Tardieu, F., & Turc, O. (2016). Ovary apical abortion under water deficit is caused by changes in sequential development of ovaries and in silk growth rate in maize. *Plant Physiology*, *171*(2), 986–996. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00268>
- Pannell, J. R. (2017). Plant Sex Determination. *Current Biology*, *27*(5), R191–R197. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.052>
- Paz, L., & Vázquez-Yanes, C. (1998). Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forest region in Mexico. *Tree Physiology*, *June*, 277–280. <http://treephys.oxfordjournals.org/content/18/4/277.short>
- Pedro, C. D., da Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Neto, M. F., & Pereira, M. G. (2009). Karyotype determination in three caricaceae species emphasizing the cultivated form (*C. papaya* L.). *Caryologia*, *62*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589660>
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, *405*(6783), 200–203. <https://doi.org/10.1038/35012103>
- Poland, J., Endelman, J., Dawson, J., Rutkoski, J., Wu, S., Manes, Y., Dreisigacker, S., Crossa, J., Sánchez-Villeda, H., Sorrells, M., & Jannink, J.-L. (2012). Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *The Plant Genome*, *5*(3), 103–113. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.06.0006>

- Porter, B. W., Paidi, M., Ming, R., Alam, M., Nishijima, W. T., & Zhu, Y. J. (2009). Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(6), 609–626. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0434-x>
- Purugganan, M. D., & Suddith, J. I. (1998). Molecular population genetics of the *Arabidopsis* Cauliflower regulatory gene: Nonneutral evolution and naturally occurring variation in floral homeotic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8130–8134. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8130>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>.
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Gilliam, M., & Xu, B. (2017).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(9), 1577–1603. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2415-7>
- Renner, S. S., & Ricklefs, R. E. (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany*, 82(5), 596–606.
- Richter, R., Kinoshita, A., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Gao, H., van Driel, A. D., Hyun, Y., Mateos, J. L., & Coupland, G. (2019). Floral regulators *FLC* and *SOCI* directly regulate expression of the B3-type transcription factor TARGET OF *FLC* AND *SVP 1* at the *Arabidopsis* shoot apex via antagonistic chromatin modifications. *PLoS Genetics*, 15(4), e1008065. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008065>
- Robles, P., & Pelaz, S. (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology*, 49(5–6), 633–643. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052020pr>
- Ronse, L.P.; Smets, E. F. (1999). The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). *Can. J. Bot.*, 77(1967), 582–598. <https://doi.org/10.1139/cjb-77-4-582>
- Ronse De Craene, L., Trhin, C., Morel, P., & Negruțiu, I. (2011). Carpeloidy in flower evolution and diversification: A comparative study in *Carica papaya* and *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 107(9), 1453–1463. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr087>
- Rutjens, B., Bao, D., Van Eck-Stouten, E., Brand, M., Smeekens, S., & Proveniers, M.

- (2009). Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *Plant Journal*, 58(4), 641–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03809.x>
- Sablowski, R. (2015). Control of patterning, growth, and differentiation by floral organ identity genes. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1065–1073. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru514>
- Saddic, L. A., Huvermann, B., Bezhani, S., Su, Y., Winter, C. M., Kwon, C. S., Collum, R. P., & Wagner, D. (2006). The *LEAFY* target *LMII* is a meristem identity regulator and acts together with *LEAFY* to regulate expression of *CAULIFLOWER*. *Development*, 133(9), 1673–1682. <https://doi.org/10.1242/dev.02331>
- Sanders, P. M., Bui, A. Q., Weterings, K., McIntire, K. N., Hsu, Y. C., Lee, P. Y., Truong, M. T., Beals, T. P., & Goldberg, R. B. (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction*, 11(6), 297–322. <https://doi.org/10.1007/s004970050158>
- Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Scales, C. T., Martinson, D. G., Pope, K. O., Pohl, M. E. D., Jones, J. G., Lentz, D. L., Nagy, C. Von, Vega, F. J., & Quitmyer, I. R. (2001). *Origin and Environmental Setting of Ancient Agriculture in the Lowlands of Mesoamerica*. 292(May), 1370–1374.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., & Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250(4983), 931–936. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.931>
- Shin, D. J., Andini, N., Hsieh, K., Yang, S., & Wang, T. H. (2019). Emerging Analytical Techniques for Rapid Pathogen Identification and Susceptibility Testing. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 12, 41–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115529>
- Simon, R., Igeño, M., & Coupland, G. (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature*, 384(7), 59–63.



- Sondur, S. N., Manshardt, R. M., & Stiles, J. I. (1996). A genetic map of papaya based on random amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *93*(4), 547–553. <https://doi.org/10.1007/BF00417946>
- Sourdille, P., Cadalen, T., Guyomarc'h, H., Snape, J. W., Perretant, M. R., Charmet, G., Boeuf, C., Bernard, S., & Bernard, M. (2003). An update of the Courtot x Chinese Spring intervarietal molecular marker linkage map for the QTL detection of agronomic traits in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*(3), 530–538. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1044-8>
- Storey, W. B. (1969). Pistillate papaya flower : A morphological anomaly. *Science, New Series*, *163*(3865), 401–405.
- Su, Y. H., Frommer, W. B., & Ludewig, U. (2004). Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *136*(2), 3104–3113. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045278>
- Takata, N., Saito, S., Tanaka Saito, C., Nanjo, T., Shinohara, K., & Uemura, M. (2009). Molecular phylogeny and expression of poplar circadian clock genes, LHY1 and LHY2. *New Phytologist*, *181*(4), 808–819. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02714.x>
- Teper-Bamnolker, P., & Samach, A. (2005). The flowering integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, *17*(10), 2661–2675. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035766>
- Theißen, G., & Becker, A. (2004). Gymnosperm orthologues of class B floral homeotic genes and their impact on understanding flower origin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *23*(2), 129–148. <https://doi.org/10.1080/07352680490433240>
- Theißen, G., Melzer, R., & Ruümler, F. (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: Linking plant development and evolution. *Development (Cambridge)*, *143*(18), 3259–3271. <https://doi.org/10.1242/dev.134080>
- Theißen, G., & Saedler, H. (2001). Floral quartets. *Nature*, *407*(25), 469–472. <https://doi.org/10.1111/dom.13526>

- Todd, C. D., & Polacco, J. C. (2006). AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *223*(5), 1108–1113. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0236-x>
- Ueno, H., Urasaki, N., Natsume, S., Yoshida, K., Tarora, K., Shudo, A., Terauchi, R., & Matsumura, H. (2015). Genome sequence comparison reveals a candidate gene involved in male–hermaphrodite differentiation in papaya (*Carica papaya*) trees. *Molecular Genetics and Genomics*, *290*(2), 661–670. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0955-9>
- 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*(2–3), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s001220100693>
- VanBuren, R., Zeng, F., Chen, C., Zhang, J., Wai, C. M., Han, J., Aryal, R., Gschwend, A. R., Wang, J., Na, J., Huang, L., Zhang, L., Miao, W., Gou, J., Arro, J., Guyot, R., Moore, R. C., Wang, M., Zee, F., ... Ming, R. (2015). Origin and domestication of papaya Y h chromosome. *Genome Research*, *524*–533. <https://doi.org/10.1101/gr.183905.114.9>
- Vanburen, R., Zeng, F., Chen, C., Zhang, J., Wai, M., Han, J., Aryal, R., Gschwend, A. R., Wang, J., Na, J., Huang, L., Zhang, L., Miao, W., Gou, J., Arro, J., Guyot, R., Moore, R. C., Wang, M., Zee, F., ... Ming, R. (2015). Origin and domestication of papaya Y h chromosome. *Genome Research*, *25*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1101/gr.183905.114.9>
- Veldboom, L. R., Lee, M., & Woodman, W. L. (1994). Molecular marker-facilitated studies in an elite maize population: I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. *Theoretical and Applied Genetics*, *88*(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/BF00222387>
- Velmurugan, J., Milbourne, D., Connolly, V., Heslop-Harrison, J. S., Anhalt, U. C. M., Lynch, M. B., & Barth, S. (2018). An immortalized genetic mapping population for perennial ryegrass: A resource for phenotyping and complex trait mapping. *Frontiers in Plant Science*, *9*(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00717>
- Wang, J., Na, J. K., Yu, Q., Gschwend, A. R., Han, J., Zeng, F., Aryal, R., VanBuren, R., Murray, J. E., Zhang, W., Navajas-Pérez, R., Feltus, F. A., Lemke, C., Tong, E. J., Chen,

- C., Wai, C. M., Singh, R., Wang, M. L., Min, X. J., ... Ming, R. (2012). Sequencing papaya X and Y chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(34), 13710–13715. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207833109>
- Werner, A. K., Medina-Escobar, N., Zulawski, M., Sparkes, I. A., Cao, F. Q., & Witte, C. P. (2013). The ureide-degrading reactions of purine ring catabolism employ three amidohydrolases and one aminohydrolase in *Arabidopsis*, soybean, and rice. *Plant Physiology*, *163*(2), 672–681. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224261>
- Werner, A. K., Sparkes, I. A., Romeis, T., & Witte, C. P. (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology*, *146*(2), 418–430. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110809>
- Wickland, D. P., Battu, G., Hudson, K. A., Diers, B. W., & Hudson, M. E. (2017). A comparison of genotyping-by-sequencing analysis methods on low-coverage crop datasets shows advantages of a new workflow, GB-eaSy. *BMC Bioinformatics*, *18*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-2000-6>
- Xue, Y., Wang, Q., Long, Q., Ng, B. L., Swerdlow, H., Burton, J., Skuce, C., Taylor, R., Abdallah, Z., Zhao, Y., MacArthur, D. G., Quail, M. A., Carter, N. P., Yang, H., & Tyler-Smith, C. (2009). Human Y Chromosome Base-Substitution Mutation Rate Measured by Direct Sequencing in a Deep-Rooting Pedigree. *Current Biology*, *19*(17), 1453–1457. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.032>
- Yu, Q., Navajas-pérez, R., Tong, E., Robertson, J., Moore, P. H., Paterson, A. H., & Ming, R. (2008). *Recent Origin of Dioecious and Gynodioecious Y Chromosomes in Papaya*. 49–57. <https://doi.org/10.1007/s12042-007-9005-7>
- Zeng, L., Zhang, Q., Sun, R., Kong, H., Zhang, N., & Ma, H. (2014). Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times. *Nature Communications*, *5*(4956), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms5956>
- Zhang, J., Boualem, A., Bendahmane, A., & Ming, R. (2014). Genomics of sex determination. *Current Opinion in Plant Biology*, *18*(1), 110–116.

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.02.012>

Zik, M., & Irish, V. F. (2003). Flower Development: Initiation, Differentiation, and Diversification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *19*, 119–140.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.134635>

Zou, C., Wang, P., & Xu, Y. (2016). Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(10), 1941–1955.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.12559>