

# Determinación sexual en *Carica papaya* L.

## Sexual determination in *Carica papaya* L.

Luz Thais Castro<sup>1</sup>, Omar Ruíz<sup>1</sup>, María Vielma<sup>1</sup> y Armando de Jesús Briceño R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Lab. GeQuimcel, Lab. Cultivos in vitro, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. E-mail: omar.ruizrivero@bbsrc.ac.uk

### Resumen

Para determinar si *Carica papaya* L. pasa por un estado "bisexual" y en que momento ocurre la determinación sexual, se estudió el desarrollo morfológico de las flores masculinas y femeninas de plantas androicas y ginoicas, respectivamente. A través de la microscopía electrónica de barrido y de luz, se observó que las flores estaminadas pasan por un estado bisexual, en sus primeros estadios, pero al alcanzar la madurez solo los estambres están bien diferenciados, mientras que el gineceo queda atrofiado, manteniéndose como un filamento no diferenciado. En cortes histológicos de 8-10 µm de grosor se observó que el tejido vascular dirigido hacia el pistilo no está diferenciado. En contraste, en flores pistiladas no se observaron estambres atrofiados tanto por microscopía de barrido como en cortes histológicos. El desarrollo morfológico de las flores masculinas es muy similar al observado en las flores masculinas de *Silene latifolia*, mientras que el desarrollo de las flores femeninas transcurre como en *Cannabis sativa*, en la cual tampoco se observan órganos inapropiados arrestados, aunque sus meristemas florales son sexualmente bipotentes. Estos resultados nos indican la gran variabilidad de formas que posee el reino vegetal para alcanzar la unisexualidad, incluso en la misma especie.

**Palabras clave:** *Carica papaya*, morfología, determinación sexual, microscopía de luz.

### Abstract

To elucidate if *Carica papaya* L. goes along a bisexual state, it was studied the development morphology of the male and female flowers in androgen and gynogen plants, respectively. Through the scanning electron microscopy (SEM) and light those mature flowers, observed, in male flowers that these go by a bisexual state, in their first stages, only when maturity is reached the stamens are well differentiated, while the gynoecium is atrophied. It is not a differentiated filament. By light microscopy was observed that vascular tissue directed toward, it isn't not differentiated in male flowers. In contrast, in female flowers stamens were not observed atrophied either by scanning electron microscopy neither by light microscopy. The morphologic development of the male flowers is very similar to the one observed in the males flowers of *Silene latifolia*, while the development of the female flowers lapses like in *Cannabis sativa*, where is observed arrested inappropriate organs, however, its floral meristem is bisexual. These results indicate the great variability that plant Kingdom posses in order to unisexuality, even on the same species.

**Key words:** *Carica papaya*, morphology, sexual determination, light microscopy.

## Introducción

La mayoría de las angiospermas poseen flores perfectas. Sin embargo un 10 % de las especies producen flores unisexuales, en donde solo estambres o carpelos se desarrollan hasta la madurez (Irish y Nelson, 1989; revisado por Dellaporta y Calderón-Urea, 1993; Grant et al, 1994<sup>b</sup>). Hay varias maneras de alcanzar la unisexualidad. Algunas especies, tales como *Spinacia oleracea*, *Cannabis sativa* y *Mercurialis annua* no forman el órgano sexual inapropiado. Mientras que otras especies, como *Asparagus officinalis*, *Zea mays* y *Silene latifolia* arrestan el órgano sexual inapropiado, en diferentes estado del desarrollo, pasando por un estado bisexual (revisado por Dellaporta y Calderón-Urea, 1994). Varios patrones de unisexualidad existen en el reino vegetal. En general las flores unisexuales pueden estar sobre una misma planta (monoecia) o en plantas separadas (dioecia).

*Carica papaya* L. es una planta de elevado interés agrícola y comercial. Su fruto, comúnmente llamado lechosa en Venezuela, se consume como fruta natural, así como también es usado como fuente natural de papaína. La mayoría de las especies del género *Carica* son dioicas, aunque existen algunas especies monoicas (Badillo 1967, 1971). Solo *C. papaya* tiene plantas con flores hermafroditas. Las características de heterossexualidad y poligamia de la lechosa reducen considerablemente la producción de frutos comerciales. Todas las formas sexuales son indistinguibles en el estado vegetativo. El sexo de las plantas de lechosa se reconoce solo cuando se inicia la floración y únicamente los frutos generados por flores pistiladas y hermafroditas poseen valor comercial (Avilán y Rengifo, 1986; Avilán et. al., 1992).

Sin embargo, el fenotipo sexual de los individuos de una población puede ser determinado si se realizan polinizaciones controladas (Hofmeyer, 1941). Con la finalidad de mejorar la rentabilidad de las plantaciones y la calidad del fruto, es imprescindible abordar un programa de mejora genética para la obtención de plantas de lechosa de alta productividad. El estudio morfológico constituye una gran ayuda para este objetivo, por lo cual el desarrollo de este trabajo constituyó un avance en este particular.

## Materiales y métodos

Los primordios y flores estaminadas, pistiladas y hermafroditas fueron recolectados en la Estación del INIA y

Escuela Granja "El Estanquillo", ambas ubicadas en San Juan de Lagunillas del Estado Mérida-Venezuela. El material fue mantenido en cámara húmeda, hasta llegar al laboratorio. Para microscopia de barrido, parte del material fue fijado con formaldehído al 3% en buffer fosfato a 4 °C por al menos 12 hr. Luego se realizaron varios con lavados con el mismo buffer. Inmediatamente se introdujeron en hidrato cloral por 24 hr. La deshidratación se realizó con serie de etanol a diferentes porcentajes (30%, 50%, 70%, 85%) durante 5-10 min. y etanol absoluto durante 2 hr, cambiándolo varias veces, por último una serie de etanol: acetona, de diferentes proporciones (4:1, 3:3,2:3 por 1 hr. y 1:4 por 24 hrs.). Para terminar de eliminar toda el agua se secó al vacío con silica gel por al menos 72 hrs. Sobre el porta-muestra fueron colocadas las muestras, para después incubarlas a temperatura ambiente y en oscuridad con tetraóxido de osmio y por último espolvorearlas con plata. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio de barrido Hitachi S-2500. Para la microscopia de luz, flores maduras frescas fueron incluídas en Tissueteck dentro tubos de crioconservación de 1,5 ml. En algunos casos, la parte superior de la flor fue eliminada, para una mejor inclusión y con los tubos destapados se sometieron a 1 atm. de vacío, alcanzada en forma lenta y por último fueron fijadas con N<sub>2</sub> líquido. Los cortes se realizaron en un micrótopo de congelación a -20 °C con un grosor de 8-10 µm. Los cortes fueron colocados sobre láminas con Poli-L-Lysina y teñidos con una solución de azul de toluidina al 0,1% en carbonato de sodio al 2,5 % (Roth, 1964). Las observaciones fueron hechas en un microscopio de luz NIKON LABPHOT-2 HFX-DX y las fotografías fueron tomadas con una cámara fotográfica FX-35DX

## Resultados y discusión

### Diferencias morfológicas entre las flores maduras pistiladas y estaminadas

Aunque en estado vegetativo no se puede determinar el sexo de las plantas de la lechosa, la diferencia es obvia en el estado maduro. Luego que florecen las plantas ginoicas y androicas poseen flores que tienen un rango entre 1 a 4 cm de longitud. Las flores femeninas son más grandes y voluminosas que las flores masculinas. Están dispuestas en racimos muy cortos de menos de 5 flores, sus pétalos son completamente libres (Figura 1a), el gineceo está compuesto de 5 carpelos fusionados (Figura 2O), el ovario es grande y liso de forma elipsoidal y el estilo posee cin-

co estigmas lobulados a modo de cornamenta de venado (Figuras 1b y c). Las flores masculinas son más pequeñas y están dispuestas en racimos colgantes con gran número de inflorescencias, sus pétalos están fusionados, formando un cáliz tubular (Figura 1d), tiene diez estambres, cinco cortos y cinco largos, que casi alcanzan la parte superior de los pétalos (Figuras 1d, e y f). En las flores femeninas no se observaron vestigios de estambres, sin embargo, en las flores masculinas existe un pistilo atrofiado, el cual emerge del centro en forma de un filamento de aproximadamente 0,8 cm de longitud (Figuras 1f y g).

### Desarrollo morfológico

Para conocer en qué punto durante el desarrollo floral ocurre la determinación sexual en lechosa y si sus flores unisexuales pasan por un estado "bisexual", se observó a través de MEB su desarrollo. Se tomó como guía para la clasificación de los estadios, los estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* (Smith, et. al., 1990) y *S. latifolia* (Grant, et. al., 1994<sup>b</sup>). Se trató de obtener primordios florales que tuvieran aproximadamente el mismo tamaño.

Como se puede observar en el Cuadro 1, primordios florales de tamaño aproximadamente igual, poseen órganos sexuales de similar tamaño. Esto sirvió como una guía de desarrollo morfológico.

Al comparar las observaciones hechas en el MEB de las flores hermafroditas de *Arabidopsis* (Smith, et. al., 1990) con las flores hermafroditas de *C. papaya*, puede observarse que no hay ningún primordio en las primeras etapas del desarrollo, sin embargo, puede inferirse que los primordios florales de 0,15 mm se encuentran entre los estados 6 y 7 (Figura 2a), en donde en los laterales del primordio emergen o se distinguen los estambres y en la parte central se observa una protuberancia que originará el gineceo. Este estado morfológico también fue observado en las flores estaminadas de manera muy similar, observándose claramente la presencia de los dos órganos sexuales (Figura 2f). Por otra parte, en las flores pistiladas se comienza del estado 6 de desarrollo, pero a diferencia de los primordios florales anteriores, no se observa primordios de estambres, dando la primera diferencia en cuanto a como ocurre o se alcanza la unisexualidad en estas flores (Figura 2n).

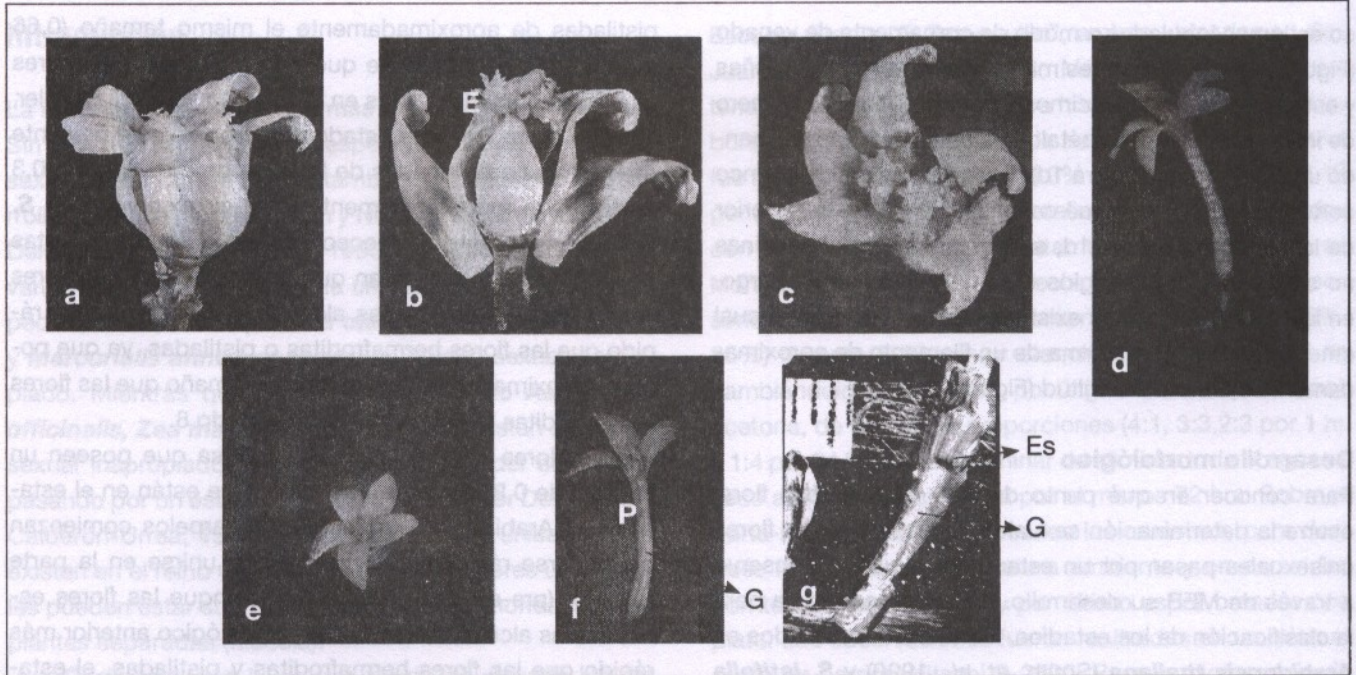
El estado 8 de *Arabidopsis* y *S. latifolia* es observado en las flores hermafroditas de lechosa cuando poseen un tamaño de 0,70 mm, con características morfológicas muy similares a las observadas en *Arabidopsis* (Figura 2b). De igual forma también fue observado en flores

pistiladas de aproximadamente el mismo tamaño (0,66 mm), con la diferencia de que no se observa estambres atrofiados como los vistos en *S. latifolia* (Grant y Saedler, 1994<sup>b</sup>) (Figura 2p). Este estado morfológico está presente en las flores estaminadas de lechosa pero de apenas 0,3 mm, siendo morfológicamente igual al observado en *S. latifolia*, en cuanto al gineceo atrofiado (Figura 2g). Estas observaciones nos indican que probablemente las flores masculinas o estaminadas alcanzan la madurez más rápido que las flores hermafroditas o pistiladas, ya que poseen aproximadamente la mitad del tamaño que las flores hermafroditas cuando están en el estado 8.

En flores hermafroditas de lechosa que poseen un tamaño de 0,8 mm se puede inferir que están en el estado 9 de *Arabidopsis*, en donde los carpelos comienzan a elongarse rápidamente, para luego unirse en la parte superior (pre-estigma) (Figura 2c). Aunque las flores estaminadas alcanzaron el estado morfológico anterior más rápido que las flores hermafroditas y pistiladas, el estado 9 fue observado en flores de aproximadamente igual tamaño que las flores hermafroditas (Figura 2h). Por otra parte a pesar de que el tamaño del "gineceo" y los estambres es de igual tamaño (Cuadro 1), tal "gineceo" está totalmente atrofiado. Este estadio no fue observado en las flores femeninas.

**Cuadro 1.** Relación de tamaño de las flores de diferente sexo con el tamaño del gineceo y androceo

Sexo				Estadio aproximado
	Flor	Gineceo	Androceo	
Estaminadas	0,3	0,073	0,17	8
	0,7	0,400	0,44	9
	1,0	0,700	0,80	10
	4,0	2,640	2,20	11
	6,3	2,750	3,30	12
	18,3	8,300	9,99	Flor madura
Pistiladas	0,3	0,180	-	6
	0,53	0,230	-	7
	0,66	0,440	-	8
	1,65	1,160	-	9
	1,86	1,410	-	10
Hermafroditas	0,15	0,030	0,07	6-7
	0,70	0,300	0,50	8
	0,83	0,40	0,44	9
	1,30	1,01	0,65	
	6,72	1,55	2,48	10
	6,82	2,42	2,79	11



**Figura 1.** Comparación de las flores maduras femeninas y masculinas de *C. papaya* L. (a,b,c) flores femeninas; (d,e,f,g) Flores masculinas. a. Vista de los pétalos (P) libres de la flor femenina. b. Ovario (O) elipsoide y liso con un estigma protuberante, en forma de "cornamenta de venado". c. Vista superior del estigma (E). d. Flor masculina madura con los pétalos fusionados (P, gamopétalos). e. Vista superior de la flor masculina, se observa los estambres sobresaliendo. f y g. Gineceo (g) atrofiado en forma de un filamento observado en las flores masculinas. Fotos tomadas con cámara digital con aumento 10X.

También se observaron flores hermafroditas que morfológicamente se asemejaron al estado 10 de *Arabidopsis* y *S. latifolia*. Con un tamaño de 6,72 mm la flor está casi completamente madura, faltando por terminar de formarse bien el estigma y con una diferencia considerable entre el gineceo y androceo, lo cual como se sabe evita el autocruzamiento (Figura 2e). Este estadio fue observado en flores estaminadas de 1 mm de longitud (Figura 2i).

El estado morfológico 11 fue observado en las flores pistiladas y masculinas, en donde al igual como *Arabidopsis* y *S. latifolia*, se detecta un crecimiento rápido de los órganos sexuales apropiados hasta alcanzar totalmente su madurez, sin embargo, como ya se ha mencionado, en las flores pistiladas no se distinguieron estaminodios (Figura 2j, k, q, r).

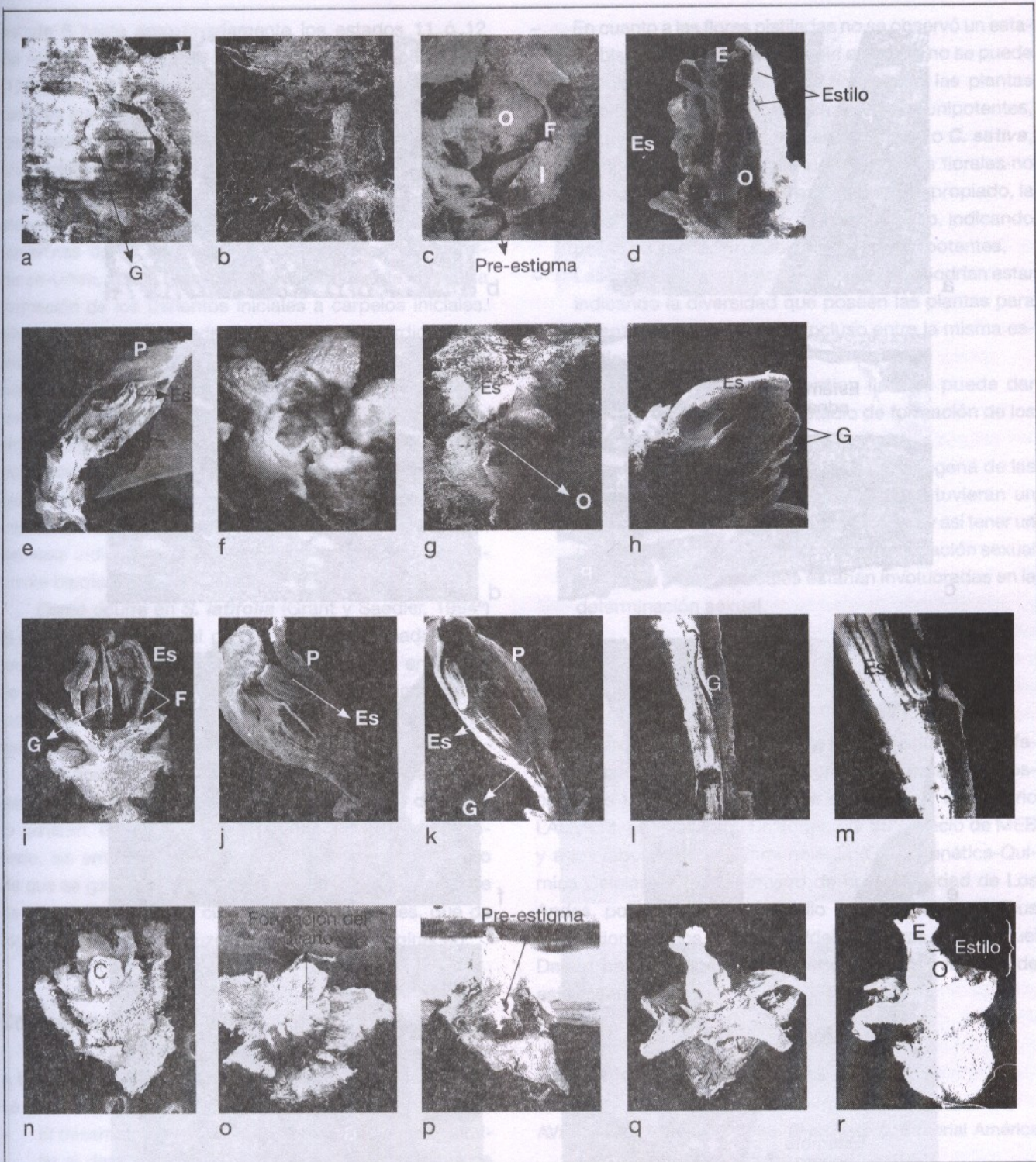
Tal como se observa también en flores maduras, la diferencia de tamaño de las flores estaminadas, pistiladas y hermafroditas es evidente (Figura 1). Aunque las flores estaminadas al principio del desarrollo alcanzan más rápido algunos estados que las flores hermafroditas y/o pistiladas, luego existe como un retardo en el crecimiento en

tamaño de la flor, lo cual probablemente podría favorecer a un mejor desarrollo de los estambres.

### Estudio histológico de las flores

A través de estudios histológicos de secciones longitudinales de 0,8-10  $\mu$ m de flores maduras, fué corroborada la presencia de un pistilodio en las flores masculinas (Figura 3a). En estas flores, el tejido vascular dirigido hacia los estambres y pétalos está totalmente desarrollado (Figura 3b, c), mientras que el tejido vascular del gineceo está atrofiado (Figura 3a), siendo una posible causa de su atrofiamiento ya que no es abastecido de nutrientes provocando así su atrofiamiento. En flores femeninas el tejido vascular del gineceo está desarrollado (Figura 3d) sin embargo, no hay estaminodios o células degeneradas que podrían generarlos en los pétalos ni en la base del gineceo de las flores pistiladas (Figura 3e, f). En flores hermafroditas el tejido vascular del gineceo y androceo está totalmente diferenciado (Figura 3g, h).

En resumen, los estados morfológicos observados en las flores estudiadas de lechosa fueron a partir del



**Figura 2.** Desarrollo morfológico de las flores hermafroditas, masculinas y femeninas. Muestras de primordios florales de diferentes tamaños fijadas con formaldehído, tetróxido de osmio, espolvoreada con plata y observadas en el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2500. Flores hermafroditas: a. 0,15 mm; b. 0,70 mm; c. 0,8 mm; d. 6,72 mm; e. 6,82 mm. Flores estaminadas: f. 1<sup>er</sup> estadio, tamaño ND; g. 0,3 mm; h. 0,7 mm; i. 1,0 mm; j. 4,0 mm; k. 6,3 mm.; l y m. 18,3 mm (detalle del pistilodio y estambres, respectivamente). Flores pistiladas: n. 0,3 mm; o. 0,53 mm; p. 0,66 mm; q. 1,65 mm; r. 1,86 mm. Abreviaturas: C= carpelos; O= ovario; G= gineceo; E = estigma; P= pétalos, Es= estambres. F= filamento



**Figura 3.** Estudio histológico de *Carica papaya*. Cortes longitudinales de flores maduras teñidas con azul de toluidina y observadas en el microscopio de luz (40X), para su explicación ver texto. Abreviaturas: F = filamento; G = gineceo, P = pétalos, T = teca; X = xilema. a, b, c. Flores estaminadas. d, e, f. Flores pistiladas y g, h. Flores hermafroditas

estado 6 hasta aproximadamente los estados 11 ó 12 de Arabidopsis. Contradiendo a lo descrito por Avilán (1992), en cuanto a la presencia en algunos casos de estambres atrofiados en las flores pistiladas, en ninguno de los estados del desarrollo observados ni en sus estudios anatómicos se les determinó la presencia de estaminodios. Probablemente las flores femeninas de *C. papaya* alcanza su unisexualidad de una forma similar a las flores femeninas de *C. sativa* (revisado por Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994), la cual pasa directamente desde la formación de los periantos iniciales a carpelos iniciales. Sin embargo, no se puede decir que los primordios florales sean sexualmente unipotentes, ya que puede ocurrir como en *Mercurialis* (Irish y Nelson, 1989), en donde tampoco se observa órganos rudimentarios del sexo opuesto, sin embargo bajo ciertas condiciones, la sexualidad puede ser revertida con un tratamiento hormonal y en algunos casos ambos órganos sexuales pueden presentarse en la misma flor, esta ocurrencia de hermafroditismo y reversión del sexo indican que los primordios florales son sexualmente bipotentes.

Como ocurre en *S. latifolia* (Grant y Saedler, 1994<sup>b</sup>) la determinación sexual de las flores estaminadas ocurre en el estado 7 del desarrollo morfológico, en donde se observó el atrofiamiento del gineceo, indicando por lo tanto que el primordio floral de las plantas androicas es sexualmente bipotente.

Las flores estaminadas por lo general no dan fruto, pero bajo ciertas condiciones de temperatura o de altura lo generan, debido a la presencia de este gineceo atrofiado, sin embargo este fruto no es comercial. El hecho de que se genere fruto indica que el tejido vascular debe de diferenciarse, por lo cual debe existir señales, que de alguna u otra forma induzcan la formación del gineceo.

## Curiosidad y realidad

### Conclusiones

A través de los estudios morfológicos con MEB se observó que:

- El desarrollo de las flores hermafroditas es muy similar al desarrollo floral de las flores hermafroditas de Arabidopsis.
- Las flores estaminadas pasan por un estado bisexual al inicio de su formación, para luego, como en *Silene*, detienen la formación del gineceo en el estado 7 del desarrollo floral.

- En cuanto a las flores pistiladas no se observó un estado bisexual o estaminodios, sin embargo no se puede concluir que los primordios florales de las plantas ginoicas son unisexuales o sexualmente unipotentes, ya que puede ocurrir como en *M. annua* o *C. sativa*, en donde a pesar de que sus primordios florales no presentan vestigios del órgano sexual inapropiado, la aplicación de hormonas revierten su sexo, indicando por lo tanto que probablemente sean bipotentes.
- Las observaciones arriba expuestas nos podrían estar indicando la diversidad que poseen las plantas para alcanzar la unisexualidad, incluso entre la misma especie.
- La medición de los primordios florales puede dar una idea aproximada del estadio de formación de los órganos sexuales
- Faltaría realizar algunas aplicaciones exógena de las hormonas o inhibidores de éstas, que tuvieran un efecto momentáneo, para ver sus efectos y así tener un panorámica más completa en la determinación sexual en *Carica papaya* y cuales estarían involucradas en la determinación sexual.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración del Profesor Ernesto Valiente, por el asesoramiento para la microscopía de barrido, así mismo se agradece al laboratorio LAQUEM, en especial al Sr. Jorge, por su servicio de MEB y a los laboratorios de Inmunología (CIV), Genética-Química Celular y Cultivos *in vitro* de la Universidad de Los Andes, por permitir el desarrollo de este trabajo en sus instalaciones. A los profesores Idel Contreras y Dr. Manuel Dagert por la cooperación en el desarrollo y revisión de este manuscrito.

### Referencias bibliográficas

- AVILÁN L., y RENGIFO. 1986. *El lechosoero*. Editorial América C. A. Caracas.
- AVILÁN L., F. LEAL y D. BATISTA. 1992. *Manual de Fruticultura*. Tomo I: Principios y manejo de la producción. 2<sup>a</sup> edición, Editorial América. Caracas-Venezuela.
- BADILLO, V. 1967. Inventario anotado de las Caricaceae hoy tenidas como validas. *R. Fac. Agro.* 4:48-66.

BADILLO, V. 1971. *Monografía de la familia Caricaceae*. Asociación de Profesores de la Universidad Central de Venezuela. pag. 220. Maracay.

DELLAPORTA, S. y A. CALDERON-URREA. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell*. 5:1241-1251.

DELLAPORTA, S. y A. CALDERON-URREA. 1994. The sex determination process in maize. *Science* 266(2):1501-1505.

GRANT, S. A. HOUBEN, B. VYSKOT, J. SIROKY, W. H. PAN, J. MACAS y H. SAEDLER. 1994<sup>a</sup>. Genetics of sex determination in flowering plants. *Dev. Genetic*. 15:214-230.

GRANT, S. R. HUNKIRCHEN y H. SAEDLER. 1994<sup>b</sup>. Developmental differences between male and female flowers in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Plant J*. 6:471-480.

HOFMYER, J. D. J. 1941. The genetics studies of *Carica papaya* L. *Chron. Bot.* 6:245-247.

IRISH, E. E. y T. M. NELSON. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants. *Plant Cell*. 1:737-744.

ROTH, I. 1964. *Microtécnica Vegetal*. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

SMITH, D. R., J. L. BOWMAN y E. M. MEYEROWITZ. 1990. Early flower developmental in Arabidopsis. *Plant. Cell*. 2:755-767.