



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EXPRESIÓN DE LA FAMILIA DE GENES SERK
DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE
Carica papaya L. INDUCIDA CON DIFERENTES
REGULADORES DE CRECIMIENTO**

Tesis que presenta

EDDY JOVANNY TURRENT ROBLES

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Eddy Jovanny Turrent Robles** titulado **“Expresión de la familia de genes SERK durante la embriogénesis somática de *Carica papaya L.* inducida con diferentes reguladores de crecimiento”** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación Agrobiotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de agosto de 2020.



Mérida, Yucatán, México, a 25 de julio de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

EDDY JOVANNY TURRENT ROBLES

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y forma parte del proyecto “Estudio del transcriptoma y proteoma de papaya (*Carica papaya*) en respuesta a estrés hídrico; identificación de genes con potencial para mejorar su eficiencia de uso de agua” con clave CB2013-221208-Z financiado por el CONACYT y bajo la dirección del Dr. Jorge M. Santamaría Fernández.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me fue otorgada con número 702057, para realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por brindarme la oportunidad de estudiar una maestría, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos para llevar a cabo mi proyecto durante el periodo 2018-2020.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mí para el desarrollo de la presente tesis y trabajo de investigación. Por su dirección durante mi proyecto de posgrado, por su dedicación hacia mí y mis compañeros.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, el Dr. Fabio Idrovo Espín, por su paciencia hacia mí y sus aportaciones en cada uno de los exámenes tutoriales que me ayudaron a culminar el presente proyecto.

A la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz, por las aportaciones brindadas a lo largo del proyecto para enriquecerlo, por el apoyo para la adquisición de materiales del laboratorio y en la revisión del presente trabajo.

A los técnicos del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular el M.C. Carlos Talavera May, el M.C. Francisco Espadas Gil y al Ing. Gastón A. Herrera Herrera, por sus aportaciones a mis experimentos y apoyo en el laboratorio.

A mis compañeras del laboratorio y amigas, la Ing. Yessica Bautista Bautista, la M.C. Amaranta Girón Ramírez y a la Dra. Arianna Chan León, mis agradecimientos infinitos por apoyarme a lo largo de toda mi estancia en el laboratorio, por brindarme tanto apoyo académico y personal, por su paciencia ante mi inexperiencia. Por la confianza y el vínculo de amistad que tuvieron a bien brindarme, muchas gracias.

Al M.C. Miguel Ángel Herrera Alamillo, por su orientación académica y personal en todo momento, por su apoyo incondicional ante las adversidades y su sabio consejo, muchas gracias.

A la Dra. Kelly M. Monja Mio, por sus aportaciones académicas y personales, por su amable apoyo en la documentación de mis experimentos y por las discusiones enriquecedoras para el tema de mi proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de CICY, por las risas y momentos compartidos, por compartir la experiencia de estar lejos de casa para alcanzar un fin mayor, por la orientación y apoyo durante el proceso de adaptación.

A la M.C. Jewel Nicole Anna Todd, por su apoyo, confianza y aliento durante los momentos buenos y los difíciles tanto en el ámbito académico como el personal, gracias.

Al Biol. Felipe Barredo Pool, por su apoyo en la preparación y documentación de los resultados de algunos de mis experimentos.

A todos esos amigos y familiares que aún a la distancia compartieron conmigo el camino para llegar a este punto, que apoyaron mis ideales. Gracias por sus consejos, por permitirme ser parte de sus vidas, por formar parte de la mía y de este proceso.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser mi fuerza de empuje, por apoyarme para conseguir una carrera universitaria y ahora un paso más en mi desarrollo académico. Por ser mis mejores ejemplos de superación, por brindarme sus consejos y apoyar mis sueños sin importar que estos implicaron estar lejos de casa. A ti madre, por enseñarme a luchar, a levantarme de cada caída, por brindarme tanto amor y fortaleza para forjarme. A ti papá por enseñarme el valor del esfuerzo y que el trabajo duro trae buenas recompensas, por enseñarme que siempre hay que tener metas claras. A ambos les debo tanto que no me alcanzaría la vida para agradecerles todo cuanto han hecho y sacrificado por mí, los amo.

A Arturo, mi hijo, porque a la mitad de este proceso viniste a ser un motivo más para salir adelante, me has impulsado a no darme por vencido y pensar en un mejor futuro para ti. Porque le diste un giro a mi vida y cambiaste la perspectiva que tenía de ella, a ti por ser parte importante de este motor.

A la Dra. Adriana Castro Ramírez, por abrirme las puertas a la ciencia y motivarme tanto a seguir adelante en esa estancia donde tuve oportunidad de compartir con usted, sé que una gran persona como usted seguramente está en el cielo y hasta allá le envío mis agradecimientos por encaminarme en esta ruta.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	1
ANTECEDENTES	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES GENERALES	3
1.2.1 Generalidades de la papaya.....	3
1.2.2 Embriogénesis somática	4
1.2.3 Función de los reguladores de crecimiento en la ES	6
1.2.4 Genes <i>SERK</i> en la embriogénesis somática	8
1.2.5 Embriogénesis somática de papaya.....	10
1.3 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPOTESIS	13
1.3.1 Preguntas de investigación	13
1.3.2 Hipótesis	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
CAPÍTULO II	16
INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>Carica papaya</i> TIPO MARADOL 16	
2.1 INTRODUCCIÓN	16
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.2.1 Colecta de material vegetal	17
2.2.2 Protocolo de embriogénesis somática	18
2.2.3 Análisis estadístico.....	21
2.3 RESULTADOS	22

2.3.1 Inducción de embriogénesis somática	22
2.4 DISCUSIÓN	29
CAPÍTULO III	33
ANÁLISIS <i>in silico</i> DE GENES HOMÓLOGOS <i>SERK</i> EN <i>Carica papaya</i>	33
3.1 INTRODUCCIÓN	33
3.2 MATERIALES Y METODOS.....	35
3.2.1 Secuencias de genes <i>SERK</i>	35
3.2.2 Diseño de oligonucleótidos para homólogos de genes <i>SERK</i> encontrados en <i>Carica papaya</i>	35
3.3 RESULTADOS	37
3.3.1 Secuencias de genes <i>SERK</i> en <i>C. papaya</i>	37
3.3.2 Diseño de oligonucleótidos	42
3.4 DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO IV	46
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES <i>SERK</i> MEDIANTE RT-PCR Y qRT-PCR, DURANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>Carica papaya L.</i>	46
4.1 INTRODUCCIÓN	46
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
4.2.1 Extracción de ARN total del material vegetal.....	47
4.2.2 Síntesis de ADNc	48
4.2.3 Condiciones de RT-PCR	49
4.2.4 Condiciones de qRT-PCR.....	50
4.2.5 Análisis estadístico de expresiones.....	51
4.3 RESULTADOS	52
4.3.1 Extracción de ARN total de diferentes tejidos de <i>C. papaya</i> tipo Maradol.....	52
4.3.2 Patrones de expresión de los genes <i>CpSERK</i> en diferentes tejidos de <i>C. papaya</i> tipo Maradol.....	53
4.3.3 Análisis de la expresión en tiempo real de los genes <i>CpSERK</i> en diferentes tejidos de <i>C. papaya</i> tipo Maradol	54
4.4 DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO V	67
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	67
5.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	67

5.2 CONCLUSIONES GENERALES.....	72
5.3 PERSPECTIVAS	75
BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Genes involucrados en los mecanismos moleculares de la inducción de embriogénesis somática (mahdavi-darvari <i>et al.</i> , 2015).	9
Figura 1.2. Diagrama de estrategia experimental a seguir durante el proyecto de tesis. .	15
Figura 2.1. Selección de frutos a coleccionar de acuerdo con sus características fisiológicas y edad.	18
Figura 2.2. Se observa fruto con semillas inmaduras de color blanco a). Extracción del embrión cigótico en campana b) vista del embrión cigótico c).....	19
Figura 2.3. Formación de callos de <i>C. papaya</i> en respuesta a los diferentes tratamientos aplicados. a) Respuesta a 2 mg/L de 2,4-D. b) Respuesta a 2 mg/L de Picloram. c) Respuesta a 2 mg/L de Dicamba, todos los resultados mostrados son a 25 días de inducción.	22
Figura 2.4. Explantes con formación de callos (%) de <i>C. papaya</i> a 60 días de inducción de embriogénesis somática.	23
Figura 2.5. Estructuras embriogénicas de <i>C. papaya</i> observadas en los explantes sometidos a los reguladores de crecimiento: Picloram, Dicamba y 2,4-D. Se observan las estructuras embriogénicas: globular, torpedo y cotiledonar. Imágenes obtenidas con el microscopio digital Dino-Lite Premier AM3113T.....	24
Figura 2.6. Formación de estructuras globulares (%), a 10 días en medio de maduración para embriogénesis somática de <i>C. papaya</i> , con los reguladores de crecimiento: Picloram, Dicamba y 2,4-D, a diferentes concentraciones.	24
Figura 2.7. Formación de estructuras cotiledonares (%) a 10 días en medio de maduración para embriogénesis somática de <i>C. papaya</i> , con los reguladores de crecimiento: Picloram, Dicamba y 2,4-D. a diferentes concentraciones.	25
Figura 2.8. Estructuras embriogénicas obtenidas en los tratamientos con diferentes concentraciones (parte superior e indicadas con flechas rojas) de cada regulador de crecimiento a los 30 días de haber transferido los callos a medio de maduración. Imágenes obtenidas con el microscopio digital Dino-Lite Premier AM3113T.	26
Figura 2.9. Embriones somáticos obtenidos (Número) con las diferentes concentraciones de cada regulador de crecimiento a 30 días de ser expuestos al medio de maduración. N= 4. Las líneas en las barras corresponden a la media +/- la desviación estándar. Las letras indican la diferencia significativa con una $p < 0.05$	27
Figura 2.10. Formación de embriones en estadio cotiledonar (número) obtenidos con las diferentes concentraciones de cada regulador de crecimiento a 30 días de ser expuestos en el medio de maduración. N= 4. Las líneas en las barras corresponden a la media +/- la desviación estándar. Las letras indican la diferencia significativa con una $p < 0.05$	28
Figura 3.1. Estructura proteica del gen SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), perteneciente al grupo con repeticiones ricas en leucina de la familia de receptores tipo cinasa.	33

- Figura 3.2.** Relación filogenética de los genes *SERK* reportados para *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK*) y *Carica papaya* (*CpSERK*). La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo en la matriz Jones Taylor Thornton (JTT). El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1000 repeticiones..... 38
- Figura 3.3.** Relación filogenética de los genes *SERK* entre *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK*) (circulo verde) y *Carica papaya* (*CpSERK*) (cuadro rojo) y matriz de distancia entre los genes *SERK* de ambas especies. En la matriz se encuentra sombreada la distancia evolutiva entre los homólogos seleccionados. 39
- Figura 3.4.** Alineamientos de las secuencias de proteínas de genes *SERK* reportados para *A. thaliana* y *C. papaya* (en verde), donde se pueden observar sombreadas en color negro las regiones conservadas entre ellas, las sombreadas en color gris son regiones específicas para cada especie. Se indican las regiones correspondientes y características a la estructura (motivos) de la proteína *SERK* con flechas y el nombre correspondiente a cada una..... 41
- Figura 3.5.** Extensión de los genes *CpSERK3* y *CpSERK2*. Gradiente de temperatura de los oligonucleótidos diseñados para la expresión de los genes *CpSERK3* y *CpSERK2*, tomando en cuenta las temperaturas promedio con que se diseñaron. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 50 pb. Par 1: primer juego de oligonucleótidos Par 2: segundo juego de oligonucleótidos Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se indica el tamaño de la banda (150 pb)..... 42
- Figura 4.1.** Análisis de la integridad de ARN total obtenido de embriones somáticos (globular, torpedo y cotiledonar) de *Carica papaya*. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio..... 53
- Figura 4.2.** Expresión basal, productos de RT-PCR para genes *CpSERK3* y *CpSERK2* en tejidos de *C. papaya* tipo Maradol. Cada columna corresponde a un tejido, en el orden: EC embrión cigótico, H hoja, T tallo, R raíz, F flor, FR fruto. Se indica el tamaño de cada amplicon del lado derecho del gen. El gen *CpEF1 α* fue utilizado como control..... 53
- Figura 4.3.** Expresión de los genes *CpSERK3* y *CpSERK2* en tejidos embrionarios obtenidos mediante embriogénesis somática de *C. papaya* tipo Maradol expuestos a 2,4-D (5 mg/L). Cada columna corresponde a un tejido en el orden: G globular, T torpedo y C cotiledonar. Se indica el tamaño de cada amplicon del lado derecho del gen. El gen *CpEF1 α* fue utilizado como control. 54
- Figura 4.4.** Curva Melting y standard de la validación mediante qRT-PCR de los genes a) *EF1 α* b) *CpSERK3* y c) *CpSERK2*. 55
- Figura 4.5.** Niveles de expresión relativa de genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en embriones somáticos (E.S) y Embrión cigótico (E.C.), y órganos de la planta: Fruto, Flor, Tallo, Hoja y Raíz de *C. papaya*. Las barras corresponden a la media +/- la desviación estándar y las letras indican las diferencias estadísticas, comparación de medias con el método de Tukey con una confianza de 95%. 56
- Figura 4.6.** Niveles de expresión relativa de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en explantes expuestos a los reguladores de crecimiento: Picloram, 2,4-D y Dicamba, para la inducción de embriogénesis somática. Las barras corresponden al promedio y las líneas

de las barras corresponden a la desviación estándar. Las letras indican las diferencias estadísticas, comparación de medias con el método de Tukey con una confianza de 95%. 57

Figura 4.7. Niveles de expresión relativa de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en explantes sometidos a 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D durante 0 horas, 6 horas, 1 día y 21 días de inducción. Las barras indican la media +/- la desviación estándar. Las letras indican los análisis estadísticos, comparación de medias con el método de Tukey con una confianza de 95%. 58

Figura 4.8. Correlación entre el número total de embriones somáticos obtenidos con 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D y el pico máximo de los niveles de expresión relativa correspondiente a los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en los explantes expuestos a estas..... 59

Figura 4.9. Correlación entre el número de embriones en estadio cotiledonar obtenidos con 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D y el pico máximo de la expresión relativa correspondiente a los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en los explantes expuestos a estas concentraciones.. 60

Figura 5.1. Proceso de embriogénesis somática de *C. papaya*, enfatizando el papel que juega la inducción del gen *CpSERK3* ante la exposición a 2,4-D, en la producción y desarrollo de embriones somáticos maduros en *C. papaya*. 74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Explantes utilizados en ES de diferentes tipos de <i>C. papaya</i>	11
Cuadro 2.1. Características de las plantas donadoras.....	17
Cuadro 2.2. Características de los frutos elegidos para inducción de embriogénesis somática.....	18
Cuadro 2.3. Composición de medio basal para inducción de ES.....	19
Cuadro 2.4. Establecimiento de tratamientos por regulador de crecimiento para la para inducción de embriogénesis somática de <i>C. papaya</i>	20
Cuadro 3.1. Secuencias de la familia de genes <i>SERK</i> en <i>C. papaya</i> encontrados y seleccionados mediante la herramienta BLAST.	37
Cuadro 3. 2. Oligonucleótidos diseñados para los genes <i>CpSERK3</i> y <i>CpSERK2</i> para el análisis de expresión durante embriogénesis somática de <i>C. papaya</i>	42
Cuadro 4.1. Secuencia de oligonucleótidos diseñados con la longitud de amplicones esperada.....	50
Cuadro 4.2. Condiciones de la validación en qRT-PCR de genes a cuantificar y gen control.	50
Cuadro 4.3. Concentración, pureza de ARN extraído y rendimiento ($\mu\text{gRNA/gPF-1}$) de los diferentes tejidos de <i>C. papaya</i> tipo Maradol.	52

INDICE DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGL15	AGAMOUS-LIKE15
ANA	Ácido naftalenacético
ANOVA	Análisis de Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BA	Benciladenina
BAK1	Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1
BAP	Bencilaminopurina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BR	Brasinólido
Cv.	Cultivar
ES	Embriogénesis somática
ESAF	Embriogénesis somática de alta frecuencia
ESBF	Embriogénesis somática de baja frecuencia
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
GA₃	Ácido giberélico
g/L	Gramos por litro
GUS	Beta-glucuronidasa
AIA	Ácido indolacético
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
JTT	Jones Taylor Thornton
KAPP	Kinase associated protein phosphatase
LEC	Leafy Cotyledon
LRR	Leucine rich repeats
LRR-RLK	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
LZ	Leucine zipper
mA	Mega amperes
mg/L	Miligramos por litro
mL	Mililitro
mM	Millimolar
MS	Murashige y Skoog
Mt	Miles de toneladas
N	Asparagina

NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
Prom	Promedio
RLK	Receptors Like Kinase
rpm	Revoluciones por minuto
qRT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SERK	Somatic Embryogenesis Receptor Kinase
SP	Signal peptide
SPP	Serina-Prolina-Prolina
T	Treonina
TDZ	Thidiazurón
TM	Transmembrane
Tm	Temperatura
V	Voltios
Var.	Variedad
VMAP	Virus Mancha Anular de la Papaya
WUS	Wuschel
Y	Tirosina
°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µgARN/gPF	Microgramos de ARN por gramos de peso fresco
µL	Microlitro

*Se ha preferido el uso de las abreviaturas inglesa debido a su amplio uso en la literatura citada

RESUMEN

Carica papaya es uno de los cultivos más comercializados y ocupa el tercer lugar de los frutos tropicales más consumidos a nivel mundial. El origen de la papaya se ubica en Mesoamérica, y se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. A nivel mundial, México ocupa el tercer lugar en producción y el primer lugar como exportador. En este cultivo, al igual que la mayoría de los cultivos producidos a gran escala, se han empleado herramientas biotecnológicas tales como las que ofrece cultivo *in vitro*, en las que destacan la micropropagación masiva y la embriogénesis somática. Ambas técnicas se han empleado tanto para la producción como para la investigación científica. En este trabajo nos enfocamos específicamente en la embriogénesis somática y la expresión de los genes *SERK* involucrados en este proceso con relación a los reguladores de crecimiento. Se realizó la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros con la ayuda de los reguladores de crecimiento: Dicamba, Picloram y 2,4-D en diferentes concentraciones. Se obtuvo el mejor resultado en la producción de callos embriogénicos y embriones somáticos desarrollados con 2,4-D a 10 mg/L, seguido por la concentración de 5 mg/L del mismo regulador. Mediante los análisis bioinformático y filogenético con las secuencias de los genes *SERK* reportados para *A. thaliana*, se identificaron dos genes de esta familia en el genoma de *C. papaya*. Se observó que comprenden los dominios característicos de esta familia y se encontró que *AtSERK2* y *CpSERK2* tienen un porcentaje de similitud de 94.57%, mientras que para los genes *AtSERK3* y *CpSERK3* se encontró 91.10% de similitud. Al realizar un análisis de la expresión de *CpSERK2* y *CpSERK3* en los diferentes órganos de la planta mediante qRT-PCR, se observó mayor expresión relativa de ambos genes en los tejidos provenientes de fruto, flor y embrión somático, siendo *CpSERK3* el que presentó el mayor nivel de expresión. Para el caso de los explantes expuestos a los reguladores de crecimiento, se encontró que ambos genes tienen una mayor expresión relativa con 2,4-D seguido de Picloram, sin embargo, el gen *CpSERK3* fue el que presentó mayor expresión y fue en presencia de 2,4-D. En el análisis de expresión en los explantes tratados con 2,4-D en concentraciones de 2, 5 y 10 mg/L, a los tiempos de exposición de 0, 6 y 24 horas, así como a 21 días, se encontró que ambos genes presentan mayor expresión a las 6 horas de exposición a la concentración de 10 mg/L. No obstante, el gen *CpSERK3* tuvo el

máximo nivel de expresión con 10 mg/L, seguido de la concentración de 5 mg/L. Estos análisis sugieren que los genes *CpSERK* están involucrados en el proceso de embriogénesis somática. Además, existe una relación entre su expresión y la concentración de auxina exógena 2,4-D. Principalmente, con el gen *CpSERK3*, se pudo observar un aumento en su expresión cuando los explantes fueron tratados con esta auxina, lo que también se correlaciona con una mayor producción de embriones somáticos.

ABSTRACT

Carica papaya is one of the most commercialized crops and it ranks third among the most consumed tropical fruits in the world. The origin of the papaya is in Mesoamerica; however, it is distributed in the tropical and subtropical regions of the world. Mexico occupies third place in production and first place as the top exporter in the world. Papaya, as with most crops produced on a large scale, requires biotechnological tools such as those offered by *in vitro* culture, particularly massive micropropagation and somatic embryogenesis. In this investigation, we specifically focus on somatic embryogenesis and the expression of *SERK* genes involved in this process and their correlation with growth regulators. Induction of somatic embryogenesis was carried out using immature zygotic embryos with the help of these growth regulators: Dicamba, Picloram and 2,4-D in different concentrations. From this, the best results were obtained using 10 mg/L of the regulator 2,4-D for the production of embryogenic calli and somatic embryos, followed by 5 mg/L. Through bioinformatic and phylogenetic analyses of the *SERK* gene sequences reported for *A. thaliana*, two genes of this family were identified in the *C. papaya* genome. The presence of characteristic domains of this family was confirmed in the *SERK* genes for *C. papaya*. It was found that *AtSERK2* and *CpSERK2* have a percentage similarity of 94.57%, while 91.10% similarity was found between the *AtSERK3* and *CpSERK3* genes. When analyzing the basal expression of *CpSERK2* and *CpSERK3* using qRT-PCR, a higher relative expression of both genes was observed in the tissues of the fruit, flower, and somatic embryo, compared with the other plant tissues analyzed. *CpSERK3* was found to have greater expression in these tissues than *CpSERK2*. In the case of explants exposed to growth regulators, it was found that both genes have a higher relative expression with 2,4-D, followed by Picloram. However, the *CpSERK3* gene had higher expression with 2,4-D as compared with *CpSERK2*. The expression of the *SERK* genes in explants treated with 2,4-D (2, 5 and 10 mg/L) during different times of exposure (0 hours, 6 hours, 24 hours and 21 days) was also analyzed. It was found that both genes had the highest expression level at a concentration of 10 mg /L 2,4-D and after 6 hours of exposure. Of the two genes, *CpSERK3* had a higher expression level at 10 mg/L, followed

by 5 mg/L of the regulator. These results suggest that *CpSERK* genes are involved in somatic embryogenesis and are influenced by the exogenous application of the auxin 2,4-D. Specifically, the gene *CpSERK3* was found to have increased expression in explants which correlated with an increase in the concentration of auxin used, as well as, an increase in the production of somatic embryos of *C. papaya*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya*) es la tercera fruta tropical más consumida en el mundo y por el dinamismo en su comercialización, es considerada una de las más importantes económicamente. Se produce en más de 60 países sobre todo en naciones tropicales y subtropicales en vías de desarrollo. México ocupa el tercer lugar entre los países con mayor producción con 951.922 Mt al año, sin embargo, México es el principal exportador a nivel mundial (FAOSTAT, 2018). En 2017 los principales destinos de exportación fueron Estados Unidos, Japón y Hong Kong, ocupando así el primer lugar con 168.7 toneladas, por un valor de 87 millones de dólares, que representó el 57% de la exportación total a nivel mundial (SENASICA, 2017).

En el mundo, a partir de diferentes cruzas se han desarrollado muchas variedades de *Carica papaya* como Rainbow, SunUp, Sunrise, Sunset Solo y Red Lady. Sin embargo, la que más se consume a nivel mundial es la variedad Maradol pese a que es la más susceptible al virus Mancha Anular de la Papaya (VMAP) (Cabrera *et al.*, 2010). Este virus de VMAP, se ha reportado como el principal factor limitante en este cultivo y se encuentra en todas las áreas donde se cultiva esta fruta.

Actualmente, las técnicas de biotecnología vegetal, como el cultivo de tejidos, pueden ayudar a solucionar problemas relacionados con la sanidad de las plantas, obteniéndose plantas libres de enfermedades que conservan características de interés, entre otros usos.

La embriogénesis somática (ES) es una de las vías de micropropagación que se han empleado en la propagación *in vitro* de la papaya (Banerjee, 2002; Fitch *et al.*, 2005). En este contexto se han utilizado distintos explantes para la inducción de embriogénesis somática de papaya, como hipocótilo (Zhu *et al.*, 2004), segmentos de hojas (Roy *et al.*, 2016) y embriones cigóticos inmaduros (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1999;

Bhattacharya *et al.*, 2002; Gutiérrez-Rosati *et al.*, 2006; Posada-Pérez *et al.*, 2007), siendo estos últimos los más utilizados debido a su respuesta y potencial en la embriogénesis somática.

El éxito de esta técnica no está ligado únicamente al explante utilizado, sino también al uso de los reguladores de crecimiento que juegan un papel importante en la división y diferenciación celular. Principalmente auxinas sintéticas que son empleadas durante el proceso de inducción. Entre éstas las más utilizadas son Dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxi acético) (Nomura y Komamine, 1995). Se ha documentado en *Arabidopsis thaliana* que la mitad de los factores de transcripción involucrados en el proceso de embriogénesis somática son inducidos por 2,4-D, debido al estrés oxidativo que causa en las células somáticas del explante. Durante esta transición de célula somática a embriogénica, las células tienen que desdiferenciarse, activar su ciclo de división celular y reorganizar su fisiología, metabolismo y patrones de expresión génica. Esto desencadena mecanismos moleculares y morfológicos relacionados con una serie de genes involucrados en la iniciación embrionaria (Gliwicka *et al.*, 2013).

La identificación y caracterización de genes marcadores para la embriogénesis somática ofrecen la posibilidad de determinar el potencial embriogénico de las células somáticas antes de que aparezcan los cambios morfológicos y proporcionar información sobre la regulación molecular de las diferentes fases de este proceso (inducción, proliferación, maduración, germinación), según la evidencia reportada en la literatura, se sugieren como genes marcadores los genes *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), *LEC* (Leafy Cotyledon) y *WUS* (Wuschel). Para que un gen o familia de genes se consideren como marcadores de embriogénesis deben presentar alta actividad durante los procesos moleculares que comprenden cada fase. En el caso de los genes *SERK* se ha descrito su actividad en diferentes procesos morfológicos en una serie de especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Entre estos procesos se encuentra la inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro*, también se han descrito como indicador de totipotencia celular (Karami *et al.*, 2009).

El presente trabajo está dirigido a evaluar la expresión de los genes *SERK* durante la inducción de embriogénesis somática de *C. papaya* mediada por diferentes reguladores de crecimiento. En este contexto, se pretende analizar la expresión de estos genes y como se relacionan con la eficiencia de las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento empleados en la formación y desarrollo de embriones somáticos.

1.2 ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1 Generalidades de la papaya

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta de origen mesoamericano que se ha extendido por amplias regiones tropicales y subtropicales del mundo, con una producción significativa en Brasil, India, Indonesia, México, Nigeria y Tailandia (Mora-Aguilera *et al.*, 1993).

La papaya pertenece a la División Tracheophyta, a la Clase Magnoliopsida, al Orden Brassicales, Familia Caricaceae, Género *Carica* L., Especie *Carica papaya* L. (ITIS, 2017).

Esta planta se considera una “hierba alta”, ya que es herbácea, pudiendo crecer en el primer año de 1.8 a 3 m y llegar a medir de 6 a 9 m, el tallo mide aproximadamente 30 a 40 cm de diámetro (Morton, 1987). La papaya es una planta considerada perenne, pero de vida corta sus hojas son parecidas a la palma, emergen del tallo, sostenidas por largos pecíolos, las flores se desarrollan en las axilas de las hojas, teniendo un olor agradable, los pétalos miden de 2.5 a 5.1 cm (Chia *et al.*, 1989).

En las poblaciones de papaya existen tres tipos de plantas respecto al sexo: hembras, machos y hermafroditas, la planta hembra siempre producirá flores femeninas por lo cual, si no existen plantas masculinas o hermafroditas cercanas, ésta no produce frutos (Pereira de Araujo, 1987). En el caso de las plantas masculinas que usualmente no producen frutos, en raras ocasiones tienen flores con expresiones femeninas pudiendo producir algunos frutos, en el caso de las hermafroditas las flores son más delgadas que

las hembras, con forma tubular. Las flores de papaya hermafrodita contienen partes masculinas y femeninas dentro de cada flor, muy juntas (Chia *et al.*, 1989).

1.2.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Existen varias teorías acerca del origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos, algunas referencias señalan el probable origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Street y Withers, 1974; Haccius, 1977), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams y Maheswaran, 1986). Los factores que determinan si un embrión somático ha tenido un origen uni o multicelular no han sido dilucidados aún.

El embrión somático presenta las siguientes características: es una estructura bipolar con un ápice radical y uno apical, tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis), histológicamente se cree que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este, presenta bandas procambiales entre los ápices (Sannasgala *et al.*, 1989).

A diferencia de los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen una nueva carga genética, sino que poseen la misma información genética de la planta madre (Freire, 2003). Evidentemente los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material vegetal, por ejemplo, el genotipo de la planta (Rodríguez-Otubo *et al.*, 2000), las condiciones de cultivo (Bornhoff y Harst, 2000), los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo (Perrin *et al.*, 2001), el tipo y estado fisiológico del explante (Fiore, 2002).

Se han observado detalles morfológicos que han revelado la existencia de cuatro fases durante la embriogénesis somática (Fujimura y Komamine, 1980), a) fase cero, las células aisladas sufren continuas divisiones hasta formar los agregados celulares embriogénicos

con la presencia de auxina en el medio de cultivo, los agregados de células formados desde las células aisladas ganan la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada del medio de cultivo, dando lugar a la fase uno, b) fase uno, la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los tres días después de transferido a medio de cultivo sin auxina, c) fase dos, ocurre una rápida división celular en ciertas partes del agregado debido a la polarización de la síntesis de ADN, dando lugar al embrión globular y su suspensor en la zona que no ocurrió división; d) fase tres, las plantas dicotiledóneas continúan el desarrollo del embrión en las etapas de corazón y torpedo. Para las especies monocotiledóneas existen las fases cero, uno y dos; pero la fase tres no, pues no se diferencian las etapas de corazón y torpedo, sino que el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por las etapas de escutelar y coleoptilar (Fujimura y Komamine, 1980).

La embriogénesis somática puede ser de manera directa o indirecta, la primera ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Además, ofrece algunas aplicaciones tales como el clonado directo de híbridos comerciales en algunas especies donde el material vegetal puede ser vendido como plantas jóvenes para trasplante a campo, de esta forma también permite el clonado rápido de un material vegetal (stock) de gran valor para el mejoramiento genético en el estado más temprano posible de su ciclo de vida después del cruzamiento (Frerire, 2003).

En la embriogénesis somática indirecta existen dos tipos, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF). Otra característica general de estos sistemas es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo, debido a la alta relación auxina/citoquinina durante la división celular y la baja relación entre estos componentes durante la fase de diferenciación (Söndahl *et al.*, 1991).

El desarrollo de un sistema para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye cuatro etapas: a) inducción de los embriones somáticos, donde se establece el estímulo celular para que inicie la ES y se formen la masa de células

proembriogénicas, b) Desarrollo de los embriones somáticos, en la cual se fomenta el crecimiento de la masa proembriogénica formada anteriormente, c) Maduración, se estimula la conversión de proembriones a embriones, durante esta etapa los embriones somáticos comienzan a acumular productos de reserva, d) Germinación, se estimula el crecimiento de los embriones, que pasan por las etapas características de su desarrollo (globular, escutelar y coleoptilar) hasta que se convierten en pequeñas plantas completas (germinación de embriones), e) Conversión, se refiere a la elongación de tallo y desarrollo de hojas hasta llegar a la aclimatación de las plantas regeneradas (Frerire, 2003).

La embriogénesis somática ha surgido como una vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Esta técnica permite incrementar las tasas de multiplicación, disminuir los costos de producción y da la posibilidad de automatizar el proceso productivo (De Feria, 2005).

1.2.3 Función de los reguladores de crecimiento en la ES

En la naturaleza, las fitohormonas desempeñan diferentes funciones en las diversas etapas de desarrollo de las plantas. Algunas de sus características más importantes son: que existen en bajas concentraciones en la planta, generalmente 10^{-3} a 10^{-12} M en el sitio de acción y se inhibe su acción con alta concentración de sí misma; cuando el sitio de síntesis no es el sitio de acción, son transportadas mayormente por el sistema vascular (floema, xilema); para producir efecto debe existir capacidad de respuesta en el sitio de acción (Öpik y Rolfe, 2005). Existen varios tipos de fitohormonas entre las que se encuentran auxinas, citocininas, ácido abscísico y giberelinas, entre otros.

Se ha demostrado que las auxinas son de los reguladores de crecimiento más importantes en la inducción de la embriogénesis somática, y un disparador básico de la expresión temprana de los genes inducibles por auxinas o asociados a la iniciación del proceso de embriogénesis somática (Abel *et al.*, 1995).

En la inducción y formación del embrión somático a partir de los proembriones es necesario adicionar al medio de cultivo auxina en bajas concentraciones o bien auxinas menos fuertes que las endógenas, principalmente cuando se trata de plantas monocotiledóneas (Frerire, 2003). Debido a la cantidad de auxinas endógenas que estas contienen no se establece un gradiente eficaz de auxinas ya que el nivel de auxinas endógenas aumenta significativamente al agregar auxinas exógenas, esto da como resultado una distribución 'homogénea' de auxinas en el embrión, lo que resulta en la incapacidad del embrión para inducir una simetría bilateral (Fischer *et al.*, 1996). En algunas especies es necesario adicionar una citocinina. Las auxinas añadidas exógenamente pueden afectar la polaridad al difundirse dentro de las masas embriogénicas provocando la inhibición del proceso iniciado por las auxinas endógenas, esto refiere que el papel de las auxinas es doble (Vondráková *et al.*, 2011).

Las auxinas promueven el crecimiento, principalmente por aumento de la expansión celular. De acuerdo con la hipótesis de crecimiento por acidificación, las auxinas estimulan la actividad H⁺-ATPasa de la membrana plasmática y provocan el bombeo de protones hacia la pared celular. Esto causa una disminución del pH que provoca la activación de expansinas, que rompen enlaces de hidrógeno y debilitan la pared, permitiendo el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también son activados por auxinas (Teale *et al.*, 2006).

Además de su acción directa sobre la actividad H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, se están estudiando candidatos a receptores de auxinas para una posterior transducción de la señal, en la que el Ca²⁺ y cambios en el pH citoplasmático jugarían un importante papel como segundos mensajeros. Las auxinas tienen muchas funciones y usos potenciales, entre estas involucran la síntesis de proteínas que participan en las transiciones a lo largo del ciclo celular. Se han detectado muchos genes cuya expresión se modifica por auxinas (Bonner *et al.*, 1973; Teale *et al.*, 2006).

En la mayoría de las especies vegetales se propone que el regulador de crecimiento sintético (2,4-D) induce un estrés oxidativo en la respuesta de las células para poder iniciar la embriogénesis somática (Shinoyama *et al.*, 2004).

El uso potencial de 2,4-D ha sido reportado como el regulador de crecimiento más eficiente para utilizar en ES en *Eleutherococcus sessiliflorus* (Choi *et al.*, 1999), *Gymnema silvester* (Ashok Kumar *et al.*, 2002), y *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant y Rashid, 2002). Se ha determinado que las auxinas sintéticas Picloram y Ácido 2,4-Diclorofenoxi acético (2,4-D) son altamente eficientes para la inducción de embriones somáticos (Kordestani *et al.*, 2008). El mecanismo de acción aún no es del todo claro, sobre todo porque no se sabe con certeza a cuáles componentes se une la auxina. Actúa sobre las hormonas que regulan el crecimiento, altera la actividad enzimática y el metabolismo de las plantas, afecta la respiración y división celular (Fuerst *et al.*, 1996). Sin embargo, se han encontrado cultivares específicos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) en los cuales solo se inducen embriones somáticos con auxinas diferentes como Dicamba (Ácido 3,6-Dicloro-o-anísico) (Medina *et al.*, 2003).

Las citocininas se utilizan en combinación con auxinas para la inducción de la ES y su principal papel en el proceso consiste en la extensa proliferación de células. Este efecto se ha observado en *Zoysia japonica* (Asano *et al.*, 1996), *Begonia gracilis* (Castillo y Smith 1997), *Oncidium sp.* (Chen y Chang 2001). Mientras que, en otras especies como el chícharo, frijol de soya y coronilla, la adición de citocininas inhibe el efecto de inducción de la auxina (Lakshmanan y Taji 2000).

La adición de ácido abscísico (ABA) durante la etapa de maduración del embrión promueve la acumulación de sustancias de reserva; esto, seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático. Sin embargo, en algunas especies no es necesaria la desecación para lograr una buena germinación (Arcioni y Mariotti, 1982; Kott y Beversdorf, 1990). Una vez obtenidos los embriones somáticos, la adición de ácido giberélico (GA₃) al medio de cultivo favorece y acelera la regeneración, así como la germinación de los embriones somáticos (Li y Qu, 2002).

1.2.4 Genes *SERK* en la embriogénesis somática

En la embriogénesis somática, las células somáticas pasan a través de un proceso continuo de división celular hasta formar agregados o callos de células indiferenciadas, este proceso es mediado por reguladores de crecimiento sintéticos, lo que da lugar a la transición de células somáticas a embriogénicas. Este proceso comprende 4 etapas: inducción, proliferación, maduración, germinación. En estas etapas, se suprimen los genes que funcionan en células diferenciadas y los genes necesarios para la embriogénesis son activados (Freire-Seijo., 2003). Dudits *et al.* (1995), señalaron que los patrones de expresión génica difieren en las diferentes etapas de embriogénesis somática. En café se observaron variaciones de expresión a lo largo de la embriogénesis somática, que podría regular la capacidad embriogénica de las células de café (Figuroa *et al.*, 2002). Genes específicamente expresados durante la embriogénesis somática pueden ser utilizados como marcadores ya que han sido identificados y caracterizados en embriones somáticos y no somáticos (Schmidt *et al.*, 1997).

De forma general para que algún gen sea considerado como marcador, debe ser sensible y detectable en pequeñas cantidades de tejido, adicionalmente deben revelar procesos específicos y característicos de cada una de las etapas de desarrollo o transiciones durante la embriogénesis (Lara-Chavez *et al.*, 2012). Los genes *SERK*, *LEC* y *WUS* son considerados marcadores de totipotencia en diferentes especies de plantas (Figura 1.1) (Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013).

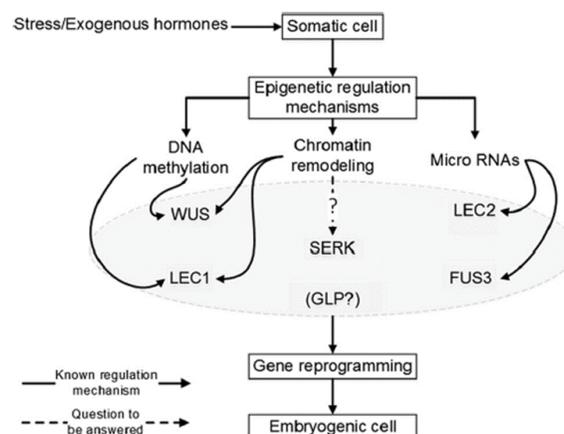


Figura 1.1. Genes involucrados en los mecanismos moleculares de la inducción de embriogénesis somática (mahdavi-darvari *et al.*, 2015).

La búsqueda de genes marcadores para indicar la transición de célula somática a célula embriogénica resultó en la identificación de *SERK* (*Somatic embryogenesis receptor kinase*). Schmidt *et al.* (1997), observaron la expresión transitoria de *SERK* en una pequeña subpoblación de células agrandadas y vacuoladas en un cultivo embriogénico derivado del explante de hipocotilo de *Daucus carota* (zanahoria) en presencia de 2,4-D.

La expresión de *SERK* se ha observado en células embriogénicas cultivadas en medio embriogénico (Thomas *et al.*, 2004), mediante microscopía electrónica de barrido en la embriogénesis somática de la vid (*Vitis vinifera*) mostraron la formación de embriones al mismo tiempo que se observó un patrón de expresión de los genes *VvSERKs*; la expresión de los genes *VvSERK1* y *VvSERK3* fue alta en las primeras semanas de formación del callo embriogénico en medio de inducción (Schellenbaum *et al.*, 2008).

Se sugiere que el gen *SERK* es un marcador adecuado para la embriogénesis somática, ya que encontraron expresión de *DsSERK* en *Daucus carota* solo en embriones somáticos y cigóticos, pero no en ningún otro tejido vegetal (Schmidt *et al.*, 1997).

1.2.5 Embriogénesis somática de papaya

Se han realizado diversos trabajos en relación con la embriogénesis somática en diferentes variedades de papaya. Tanto como modelo experimental para la regeneración de plantas transformadas (Cabrera Ponce *et al.*, 1995), como enfocados a la producción masiva por micropropagación (Posada *et al.*, 2007) y escalamiento en biorreactores (Posada *et al.*, 2017). Se han publicado trabajos en los cuales mencionan el uso de distintos tipos de explantes tales como procedentes de la raíz de la planta de papaya, yema apical, tallo y embriones cigóticos, entre otros, para inducir embriogénesis somática, así como el uso de reguladores de crecimiento (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Explantes utilizados en ES de diferentes tipos de *C. papaya*.

ESPECIE	PROCEDENCIA DEL EXPLANTE	REFERENCIA
<i>Carica papaya</i> L. (Sunrise)	Raíz, yema apical y tallo	Chen <i>et al.</i> , 1987.
<i>Carica papaya</i> L. (Maradol)	Embriones cigóticos inmaduros	Cabrera-Ponce <i>et al.</i> , 1995.
<i>Carica papaya</i> L. (Sunrise)	Embriones cigóticos inmaduros	Cai <i>et al.</i> , 1999.
<i>Carica papaya</i> L. (Washington y Honey dew)	Embriones cigóticos inmaduros	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2002.
<i>Carica papaya</i> L. (Wonder Blight)	Anteras	Rimberia <i>et al.</i> , 2005.
<i>Carica papaya</i> L. (PT-101-B)	Embriones cigóticos inmaduros	Gutiérrez-Rosati <i>et al.</i> , 2006.
<i>Carica papaya</i> L. (Maradol)	Embriones cigóticos inmaduros	Posada-Pérez <i>et al.</i> , 2007.
<i>Carica papaya</i> L. (cv. Co7)	Embriones cigóticos inmaduros	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2010.
<i>Carica papaya</i> L. (cv. Shahi)	Segmentos de hoja	Roy <i>et al.</i> , 2016.
<i>Carica papaya</i> L. (Maradol)	Embriones cigóticos inmaduros	Idrovo-Espín, 2012.
<i>Carica papaya</i> L. (Maradol)	Embriones cigóticos inmaduros	Estrella <i>et al.</i> , 2017.

Chen *et al.* (1987) demostraron que es posible la inducción de embriogénesis somática de papaya a partir de explantes como raíz, yema apical y tallo de las variedades Sunrise y Solo. Sin embargo, el mismo grupo de investigación obtuvo mayor eficiencia de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros provenientes de híbridos de *C. papaya* y *C. cauliflora*, estos llegaron a desarrollar plantas mediante la manipulación de reguladores de crecimiento y fueron trasplantadas exitosamente en campo.

Cabrera-Ponce *et al.* (1995) reportaron un sistema de transformación genética de *C. papaya* con el fin de obtener resistencia a herbicidas. Se comparó el resultado de bombardeo con partículas a tejidos de embriones cigóticos y callos embriogénicos obtenidos a partir de embriones cigóticos. Los callos embriogénicos se obtuvieron con un medio de cultivo que contenía 10 mg/L de 2,4-D como inductor de embriogénesis. En el caso de los embriones cigóticos bombardeados se obtuvo una eficiencia de 8 clones transformados, para el caso de los callos embriogénicos se presentó una eficiencia de 60 clones transformados por cada gramo de peso fresco de callo bombardeado.

Del mismo modo se ha reportado que la producción de callos embriogénicos *en Carica papaya* también es favorecida con bajas concentraciones (9 μ M) de 2,4-D (Monmarson *et al.*, 1995). Cai *et al.* (1999) desarrollaron un protocolo eficiente para transformación y regeneración de papaya con el fin de obtener una variedad resistente al Virus de la mancha anular de la papaya (VMAP). El protocolo consistió en bombardear embriones somáticos obtenidos partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya* var. Sunrise con el uso de 2,4-D a la concentración de 10 mg/L. Se llevó a cabo la regeneración de plantas a partir de los embriones transformados.

Posada-Pérez *et al.* (2007) reportan un sistema de embriogénesis somática de la var. Maradol, se desarrolló a partir de embriones cigóticos inmaduros con diferentes concentraciones de 2,4-D (3, 5, 10, 15 mg/L) para la fase de inducción. La mayor frecuencia de embriones somáticos fue de 64.7 % y se obtuvo con la concentración de 5 mg/L de 2,4-D.

1.3 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPOTESIS

1.3.1 Preguntas de investigación

¿Qué regulador de crecimiento y a que concentración es más eficiente para la inducción de embriogénesis somática *Carica papaya* L.?

¿Cuántos miembros de la familia de genes *SERK* existen en *C. papaya* en relación con los de *A. thaliana* y cuál es su estructura?

¿Cuál es el patrón de expresión de los genes *SERK* durante la embriogénesis somática y si varía en función del regulador de crecimiento utilizado y su concentración?

¿A qué periodo de tiempo desde la formación de callos, los genes *SERK* en *C. papaya* se expresan más y con qué regulador de crecimiento?

¿Existe una relación entre los niveles de expresión de los genes *SERK* de *C. papaya* con la eficiencia en la formación y desarrollo de embriones somáticos?

1.3.2 Hipótesis

El nivel de la expresión de los genes *SERK* varía de acuerdo con el regulador de crecimiento y la concentración utilizada, en la inducción de la embriogénesis somática de *Carica papaya* y está correlacionado con la producción de embriones somáticos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de los genes *SERK* durante la embriogénesis somática de Papaya (*Carica Papaya* L.) utilizando diferentes reguladores de crecimiento, tiempo y diferentes concentraciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inducir embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya* utilizando distintos reguladores de crecimiento y concentraciones.
2. Evaluar la eficiencia de los reguladores de crecimiento Dicamba, Picloram y 2,4-D, y las concentraciones utilizadas.
3. Analizar la estructura (dominios característicos) y filogenia de posibles homólogos de secuencias tipo *SERK* encontradas en el genoma de *C. papaya*
4. Analizar la expresión diferencial de los genes *SERK* durante el proceso de embriogénesis somática para cada fitorregulador y concentración utilizada.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia para seguir durante este proyecto de tesis comprende tres etapas (Figura 1.2), la primera consistió en la colecta de frutos inmaduros de papaya tipo Maradol, seguido de la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros (Capítulo II). La segunda etapa comprendió los análisis bioinformáticos de los genes *SERK* involucrados en la embriogénesis somática (Capítulo III). En la última etapa se analizó la expresión de los genes *SERK* durante el proceso de embriogénesis somática inducida por diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (Capítulo IV).

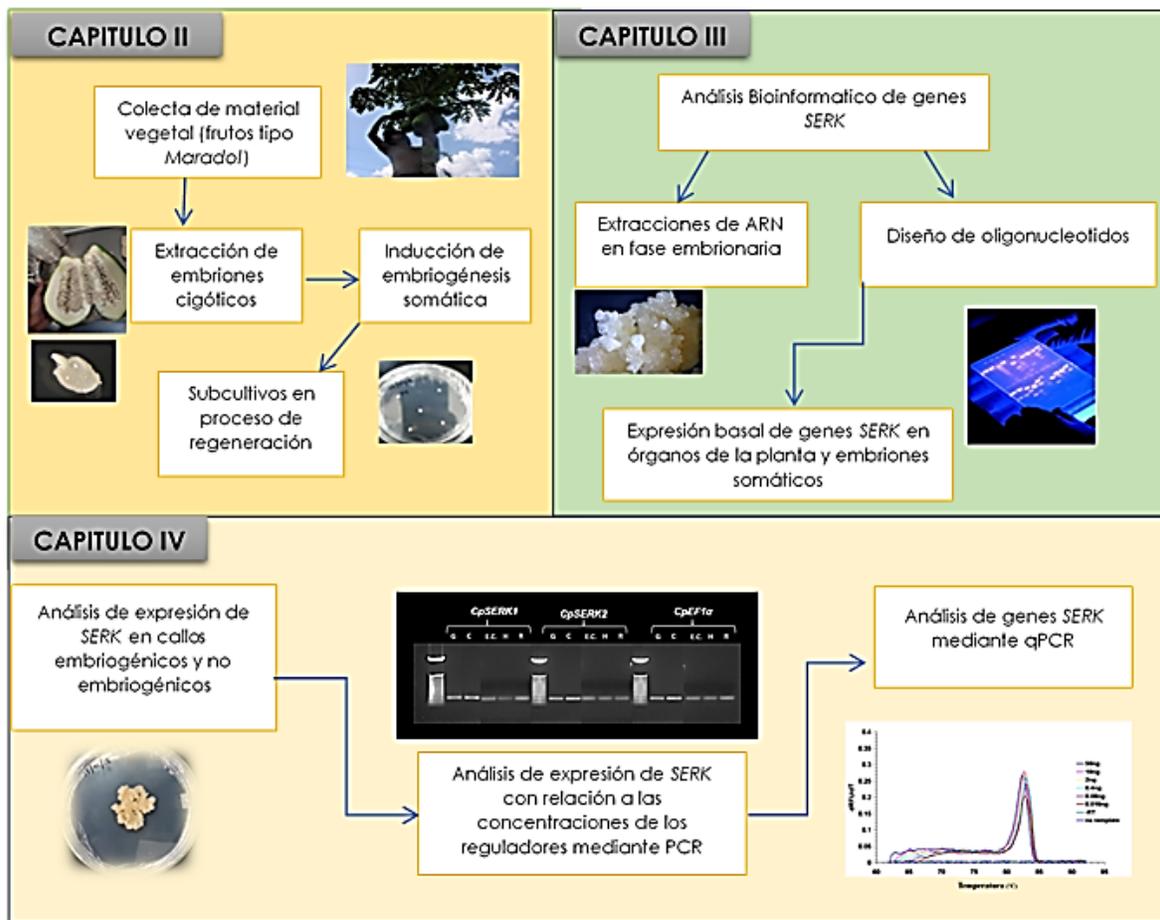


Figura 1.2. Diagrama de estrategia experimental a seguir durante el proyecto de tesis.

CAPÍTULO II

INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Carica papaya* TIPO MARADOL

2.1 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es una muy útil técnica de micropropagación en la cual diferentes factores se encuentran involucrados, como son el tipo de explante, tipo y concentración de reguladores de crecimiento, condiciones de cultivo, etc. (Rose *et al.*, 2010; Monja *et al.*, 2016). En la ES de papaya diferentes tipos de explantes han sido utilizados, como brotes apicales y radicales, así como hipocótilos (Fitch y Manshardt, 1990), embriones cigóticos inmaduros (Ramaswamy *et al.*, 2010; Idrovo-Espín, 2012; Estrella *et al.*, 2017). Los reguladores de crecimiento que se han reportado en la inducción de la ES de papaya, han sido BA, ANA (De Bruijne *et al.*, 1974), AIA (Vega de Rojas y Kitto 1991) y 2,4-D (Posada *et al.*, 2007).

Litz y Conover en 1983 reportaron embriogénesis somática mediante el cultivo de células en suspensión obtenidas a partir de callos ovulares de *C. papaya* (Cv. Co7), sin embargo, se presentó una serie de anomalías tales como incapacidad de los embriones somáticos para convertirse en plántulas completas, anormalidades en el crecimiento del meristema apical y el establecimiento de plantas en condiciones de campo. Tampoco reportaron las características de los tejidos embrionarios ni la frecuencia de regeneración, tomando en cuenta estos reportes, se ha propuesto mitigar estos problemas de embriogénesis somática mediante el uso de embriones cigóticos inmaduros.

Chen *et al.* (1991) reportaron que se logró un 72.0% y Gallardo *et al.* (2002) reportaron un 71.0%, de supervivencia de las plántulas de *C. papaya* obtenidas mediante embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros. Del mismo modo, Posada *et al.* (2007) han reportado el proceso de regeneración de plantas de papaya (var. Maradol) mediante el uso de embriones cigóticos inmaduros y diferentes concentraciones de 2,4-D.

En el presente capítulo se estudió el uso de 3 auxinas (Dicamba, Picloram y 2,4-D) en diferentes concentraciones durante la inducción de *C. papaya*, utilizando como explantes embriones inmaduros. Se estudió la relación de estas auxinas con el número de embriones obtenidos y desarrollados.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colecta de material vegetal

Se colectaron 8 frutos de papaya tipo Maradol en estado inmaduro provenientes de un Campo comercial en el interior de estado de Yucatán (Localización 20°89'96" Latitud norte, 88°19' longitud oeste). Se seleccionaron distintas plantas tomando en cuenta la apariencia y características de éstas (Cuadro 2.1), la edad de los frutos fue de 90 y 120 días después de la antesis. Se seleccionó el sexto fruto arriba del que estaba en estado de maduración (tres líneas amarillas), ya que son los frutos y semillas ideales para la extracción de embriones inmaduros (Figura 2.1).

Cuadro 2.1. Características de las plantas donadoras.

Planta	No. De hojas	No. De frutos	Altura de planta (m)
1	18	5	2
2	15	20	3
3	17	6	2.5
4	20	14	3.5
5	20	17	3
6	20	18	4
7	18	15	3.5
8	20	12	4



Figura 2.1. Selección de frutos a coleccionar de acuerdo con sus características fisiológicas y edad.

De los frutos colectados se seleccionaron dos, para obtener los embriones y así llevar a cabo la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros, tomando en cuenta su tamaño y peso para obtener la mayor cantidad de semillas (Cuadro 2.2)

Cuadro 2.2. Características de los frutos elegidos para inducción de embriogénesis somática.

Fruto	Peso (kg)	No. Aproximado de semillas
1	1.526	350
2	2.576	400

2.2.2 Protocolo de embriogénesis somática

Inducción

Para la inducción de embriogénesis somática en *Carica papaya*, se utilizaron embriones cigóticos inmaduros extraídos de las semillas de los frutos seleccionados con anterioridad (Figura 2.2). Se planteó el estudio de tres reguladores de crecimiento en 5 diferentes tratamientos, incluyendo un control para cada uno. Se usaron un promedio de 70 semillas con cada regulador de crecimiento: a) 2,4-D, b) Picloram y c) Dicamba en

concentraciones de 2, 3, 5 y 10 mg/L de cada uno de estos. El medio de cultivo basal fue el de Murashige y Skoog (MS, 1967), de acuerdo con el protocolo establecido por el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Composición de medio basal para inducción de ES.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN (L)
Sales MS 50%	2.215 g
Mio-inositol	0.1 g
L-glutamina	0.4 g
Agar	8 g
Sacarosa	60 g

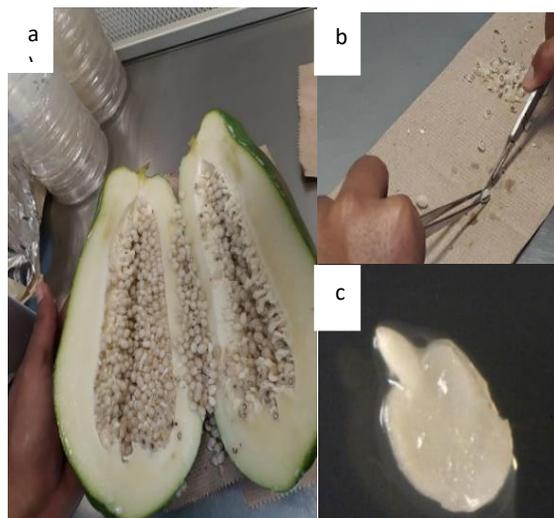


Figura 2.2. Se observa fruto con semillas inmaduras de color blanco a). Extracción del embrión cigótico en campana b) vista del embrión cigótico c).

Los tratamientos utilizados para cada regulador de crecimiento comprendieron cuatro repeticiones para cada uno, así mismo se indujo un tratamiento control el cual no contenía reguladores de crecimiento (Cuadro 2.4). De los frutos seleccionados se

extrajeran un total de 65 embriones cigóticos para inducir embriogénesis somática con Picloram, 75 para inducirla con 2,4-D, 70 para inducir ES con Dicamba y 25 embriones para el medio control.

Cuadro 2.4. Establecimiento de tratamientos por regulador de crecimiento para la para inducción de embriogénesis somática de *C. papaya*.

Tratamiento	2,4-D	Tratamiento	Dicamba	Tratamiento	Picloram	Repeticiones por cada Tratamiento
T0	0 mg/l	T0	0 mg/l	T0	0 mg/l	4
T1	2 mg/L	T1	2 mg/L	T1	2 mg/L	4
T2	3 mg/L	T2	3 mg/L	T2	3 mg/L	4
T3	5 mg/L	T3	5 mg/L	T3	5 mg/L	4
T4	10 mg/L	T4	10 mg/L	T4	10 mg/L	4

Los embriones sometidos a inducción se sub-cultivaron cada 21 días en medio fresco con la composición inicial, se mantuvieron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 °C. Se llevó a cabo un seguimiento diario de observación hasta por 80 días de los embriones cigóticos hasta que se observó la aparición de callos embriogénicos, con la intención de evaluar el porcentaje embriones cigóticos que generaron callos embriogénicos. Posterior a 80 días en medio de cultivo para inducción de callos embriogénicos, se transfirieron los embriones cigóticos que presentaban respuesta a la formación de callo a un medio de cultivo para maduración.

Maduración

Este medio consistió en el medio basal utilizado para la inducción, pero sin reguladores de crecimiento el cual estaba compuesto de la siguiente manera: sales MS al 50%, Mio-inositol 0.1 g/L, L-glutamina 0.4 g/L, agar 8 g/L, sacarosa 60 g/L y con un pH de 5.75, se mantuvieron en oscuridad debido a la sensibilidad de los reguladores de crecimiento a la luz durante un mes (30 días). Posteriormente, se realizaron observaciones diarias del estado de desarrollo y formación de las diferentes estructuras embriogénicas como globular, torpedo y cotiledonar. Las observaciones fueron documentadas con el

microscopio digital Dino-Lite Premier AM3113T de la marca DinoLite, el cual cuenta con dos rangos de aumentos: rango inferior de 20x a 50x, y rango superior, superior a 200x.

2.2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la respuesta a cada uno de los tratamientos utilizados se realizó un conteo de los embriones en etapa de torpedo, debido a que es la estructura embriogénica más desarrollada que se observó. Los datos obtenidos a partir del conteo se sometieron a un análisis ANOVA de un factor utilizando el software estadístico Minitab 18, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, con una comparación de medias por el método de Tukey y con una confianza de 95%.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Inducción de embriogénesis somática

Después de 25 días en medio de inducción, se pudo observar que el mejor resultado en la formación de callos se obtuvo en la mayoría de los tratamientos con 2,4-D, los tratamientos con Picloram y Dicamba presentaron oxidación en el tejido del explante (Figura 2.3). A 60 días de observación antes de ser transferidos al medio de maduración, se encontró que el tratamiento con 10 mg/L de 2,4-D presentó un 89% de explantes con formación de callos, seguido por el de 10 mg/L de Dicamba con 76% de explantes con formación de callos. Para el caso de 2,4-D se observó formación de callos en todas las concentraciones usadas, con Picloram el mayor porcentaje de la formación de callos se obtuvo con 5 mg/L presentando un 64%, para Dicamba no se observó formación de callos en la concentración de 2 mg/L (Figura 2.4).



Figura 2.3. Formación de callos de *C. papaya* en respuesta a los diferentes tratamientos aplicados. a) Respuesta a 2 mg/L de 2,4-D. b) Respuesta a 2 mg/L de Picloram. c) Respuesta a 2 mg/L de Dicamba, todos los resultados mostrados son a 25 días de inducción.

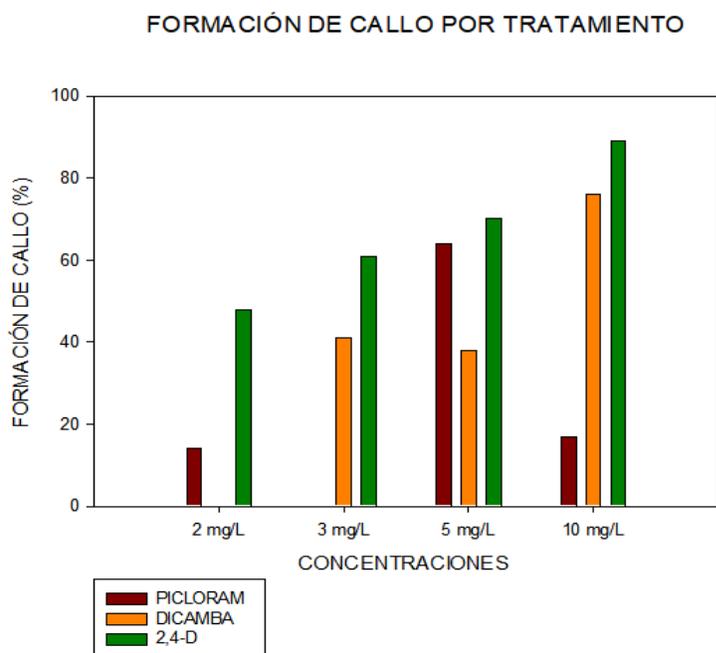


Figura 2.4. Explantes con formación de callos (%) de *C. papaya* a 60 días de inducción de embriogénesis somática.

Después de 30 días en el medio de maduración, el T0 de cada uno de los reguladores no presentó formación de callo. Por el contrario, con la mayoría de las concentraciones de cada uno de los reguladores utilizados se encontraron estructuras en estadio globular, torpedo y cotiledonar (Figura 2.5). De acuerdo con las observaciones que se realizaron durante los primeros 10 días del proceso de maduración, se pudo documentar la presencia de estructuras embriogénicas en estadio globular y cotiledonar. El tratamiento que presentó una mejor respuesta en la formación de embriones globulares fue el de 3 mg/L de Picloram con 58%, para Dicamba el mayor porcentaje de estas estructuras se presentó también a 3 mg/L con 26%, para el caso de 2,4-D con el tratamiento de 2 mg/L se obtuvo un 29% de estructuras globulares. Fue el regulador de crecimiento Picloram con el que se pudo apreciar la mayor cantidad de estructuras globulares (Figura 2.6). Sin embargo, se encontró que el tratamiento con mayor porcentaje de embriones cotiledonares es el de 10 mg/L de 2,4-D con 74%, seguido por un 68% que se observó con el de 5 mg/L del mismo regulador.

Con Dicamba, el mayor porcentaje fue de 65% y tuvo lugar con el tratamiento de 10 mg/L, en el caso de Picloram, el porcentaje más alto fue de 31% con 5 mg/L (Figura 2.7).

Se observó que los tratamientos de 2,4-D presentaron un mayor porcentaje de embriones en estadio cotiledonar que los tratamientos en donde se utilizaron Dicamba y Picloram. Se encontró que el tratamiento de 10 y 5 mg/L de 2,4-D presentó diferencias estadísticamente significativas, con respecto a los tratamientos de Dicamba y Picloram a las mismas concentraciones.

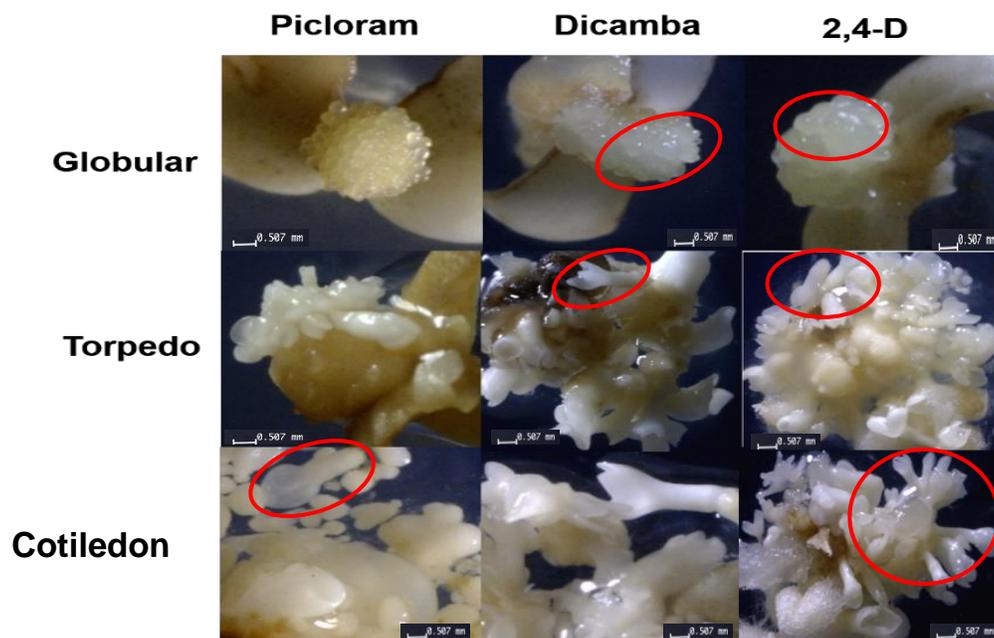


Figura 2.5. Estructuras embriónicas de *C. papaya* observadas en los explantes sometidos a los reguladores de crecimiento: Picloram, Dicamba y 2,4-D. Se observan las estructuras embriónicas: globular, torpedo y cotiledonar. Imágenes obtenidas con el microscopio digital Dino-Lite Premier AM3113T.

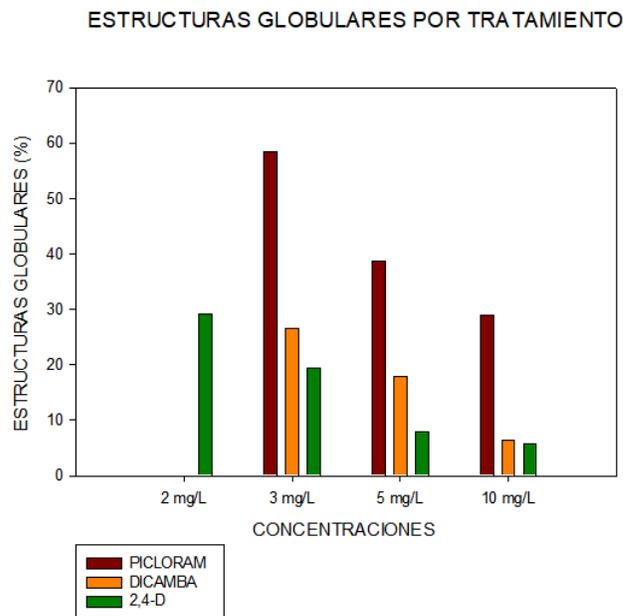


Figura 2.6. 27Formación de estructuras globulares (%) a 10 días en medio de maduración para embriogénesis somática de *C. papaya*, con los reguladores de crecimiento: Picloram, Dicamba y 2,4-D. a diferentes concentraciones

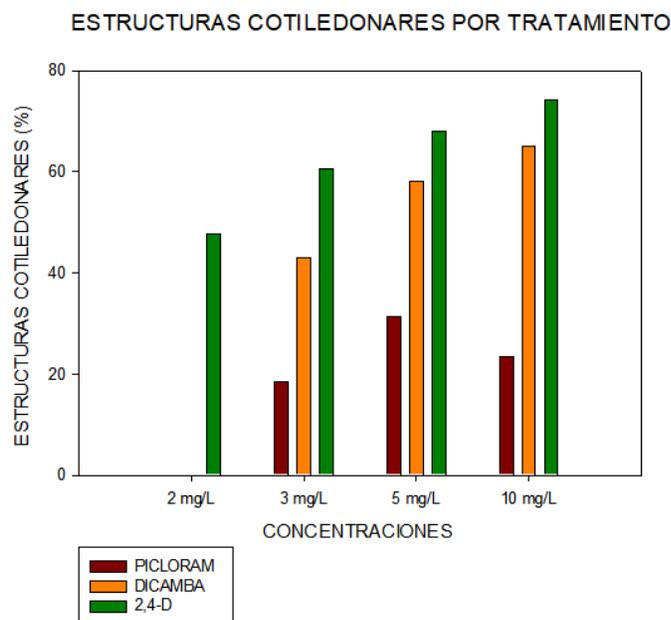
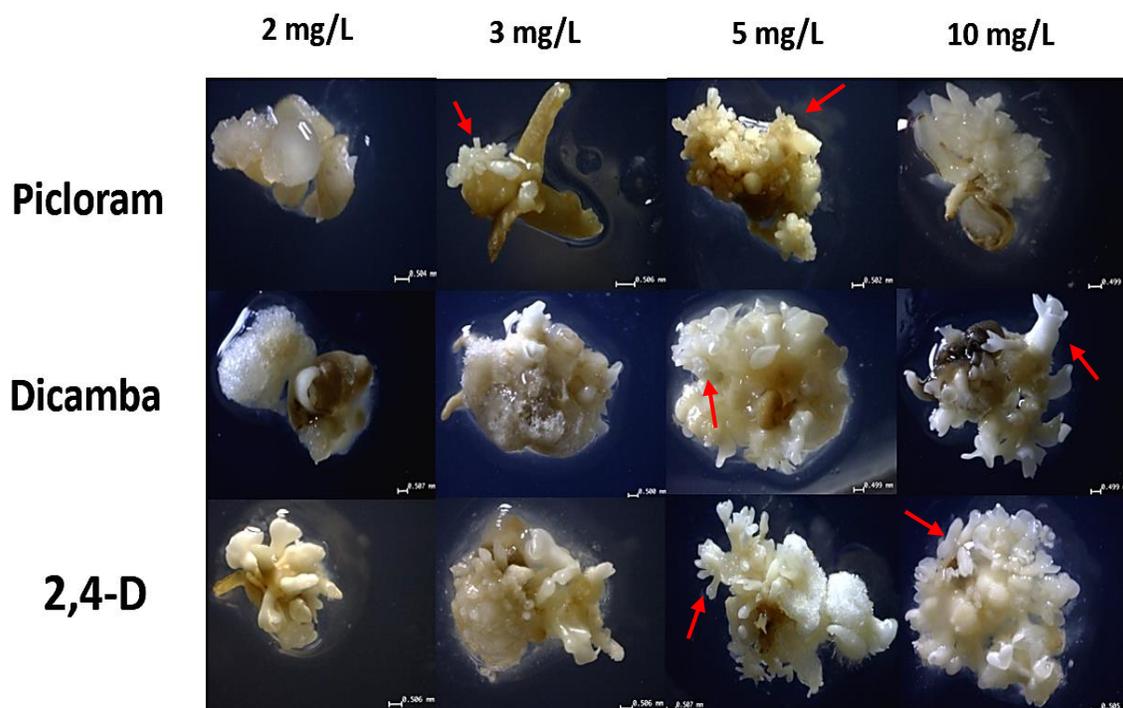


Figura 2.7. Formación de estructuras cotiledonares (%) a 10 días en medio de maduración para embriogénesis somática de *C. papaya*, con los reguladores de crecimiento: Picloram, Dicamba y 2,4-D. a diferentes concentraciones.

2.3.2 Número total de embriones y número de embriones en etapa cotiledonar

Se realizó un conteo de los embriones somáticos presentes a los 30 días de haber transferido los callos a medio de maduración para cada concentración y regulador utilizado (Figura 2.8). De acuerdo con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico donde se pudo observar que el mejor tratamiento fue el de 10 mg/L de 2,4-D con 93% de embriones producidos, seguido por el que cuenta con 5 mg/L del mismo regulador con 82% de embriones. Siendo estos los que presentaron mayor respuesta en la inducción de embriogénesis somática. Para el caso de Dicamba, el mejor tratamiento fue el de 5 mg/L con el que se obtuvo 77% de embriones y para Picloram, también se observó mejor respuesta con el tratamiento de 5 mg/L con 66% de embriones. El menor porcentaje de embriones somáticos fue de 14% y se obtuvo con el tratamiento de 3 mg/L de Picloram (Figura 2.9).



ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL NUMERO TOTAL DE EMBRIONES SOMÁTICOS

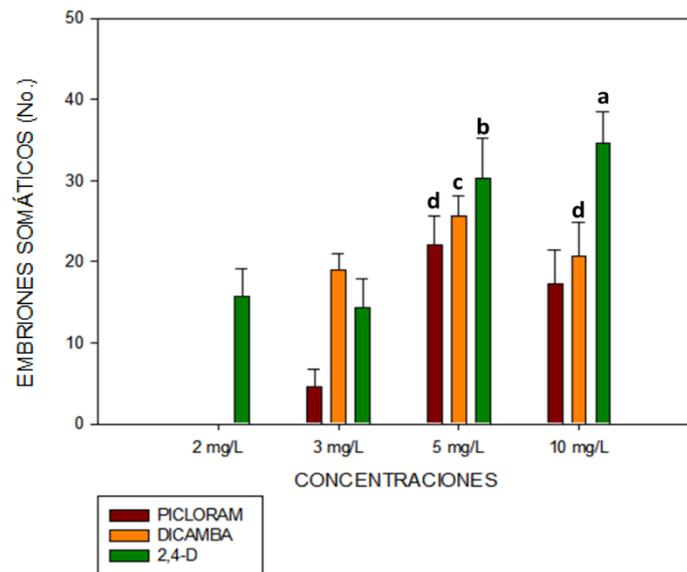


Figura 2.9. Embriones somáticos obtenidos (Número) con las diferentes concentraciones de cada regulador de crecimiento a 30 días de ser expuestos al medio de maduración. N= 4. Las líneas en las barras corresponden a la media +/- la desviación estándar. Las letras indican la diferencia significativa con una $p < 0.05$.

Se realizó un análisis estadístico para determinar el mejor tratamiento respecto al desarrollo embrionario, respecto al efecto de los reguladores de crecimiento, se presentó mayor número de embriones en estadio cotiledonar con 2,4-D, seguido por Dicamba. Para las diferentes concentraciones, se encontró que al igual que en el caso del número total de embriones, el regulador de crecimiento con mayor efecto fue 2,4-D a 10 mg/L con un 85% de estructuras cotiledonares, seguido por el de 5 mg/L del mismo regulador con 70%. Dicamba presentó mayor porcentaje de embriones maduros con 5 mg/L el cual fue de 61%, para Picloram el porcentaje más alto fue de 48% con el tratamiento de 5 mg/L (Figura 2.10). Es decir, que a 10 mg/L de 2,4-D existe un mayor número de embriones y desarrollo embrionario.

Los tratamientos de 2 mg/L tanto de Picloram como de Dicamba no presentaron embriones en estadio cotiledonar, siendo estos los tratamientos menos eficientes para la inducción de embriogénesis somática de *C. papaya*.

ANALISIS ESTADISTICO DE EMBRIONES SOMÁTICOS COTILEDONARES

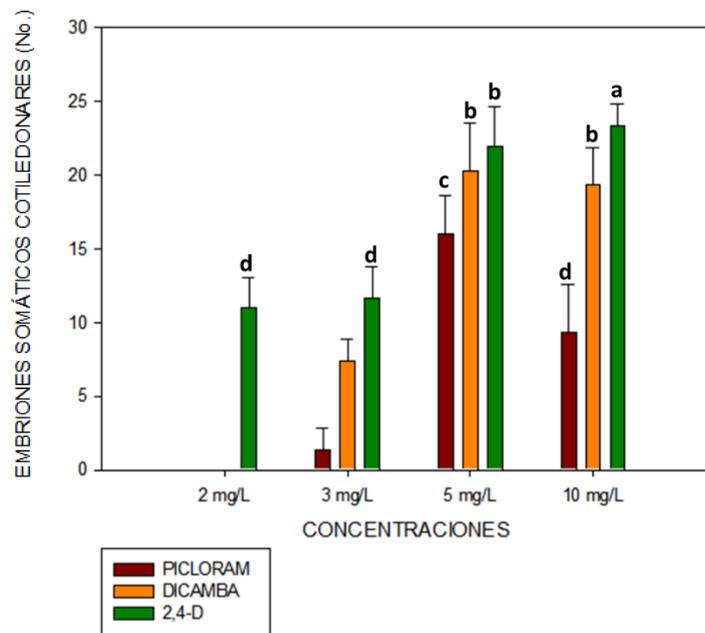


Figura 2.10. Formación de embriones en estadio cotiledonar (número) obtenidos con las diferentes concentraciones de cada regulador de crecimiento a 30 días de ser expuestos en el medio de maduración. N= 4. Las líneas en las barras corresponden a la media +/- la desviación estándar. Las letras indican la diferencia significativa con una $p < 0.05$.

2.4 DISCUSIÓN

En la presente tesis, se utilizó la técnica de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros. Se realizó la colecta de frutos que se encontraban entre 90 y 120 días después de anthesis para asegurar la obtención de embriones cigóticos inmaduros de manera similar a lo reportado por Fitch *et al.* (1990), Bhattacharya *et al.* (2002) y Anandan *et al.* (2008).

Arora y Singh (1978) reportaron que en *C. papaya* obtuvieron proliferación de callos al 100% con un tratamiento de ANA a 0.5 mg/L, seguido por un resultado similar 5 mg/L de 2,4-D. Del mismo modo Anandan *et al.* (2008) indujeron ES con embriones cigóticos inmaduros con los reguladores de crecimiento TDZ y 2,4-D, obtuvieron la formación de callos más alta (93%) con 5 μ M de TDZ. Sin embargo, la frecuencia de embriones somáticos fue de 12% y aunque el tratamiento con 2,4-D (2.0 mg/L) produjo sólo el 87% de callos, el grado de embriogénesis fue mayor (55%) lo que indica el hecho de que el medio de inducción de callos juega un papel vital en la determinación de la embriogénesis somática en papaya.

En el presente trabajo, los embriones cigóticos estuvieron incubados en oscuridad en el medio de inducción durante 4 o 5 semanas, con los diferentes reguladores de crecimiento, debido a que se ha sugerido que de manera natural las auxinas se acumulan en las partes que reciben menos luz, dando lugar a la elongación y división celular (Taiz y Zeiger, 2002). Así mismo, el tratamiento con oscuridad también evita la degradación de los reguladores de crecimiento que se encuentran en el medio, ya que estos reaccionan con los componentes del medio y son sensibles a la luz. Otros autores también reportan mayor eficiencia de inducción de ES bajo condiciones de oscuridad, como es el caso de Pérez *et al.* (1998), que lo reportan para diferentes cultivares de cítricos. Cabe mencionar que este mismo grupo de investigación, pudo observar que la producción de embriones fue mayor en los óvulos colectados de frutos inmaduros e incubados en condiciones de oscuridad. Del mismo modo Bhattacharya *et al.* (2002) reportaron los resultados de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros de diferentes cultivares de papaya con el uso del regulador de crecimiento 2,4,5-Triclorofenoxiacético

(2,4,5-T). Obtuvieron un porcentaje de 72% del cultivar Honey dew cuando se encontraba en oscuridad las 24 horas y de 15% al estar expuestos a 16 horas de luz.

Durante nuestro experimento, se observó la formación de callos a partir de los 7 días de inducción y hubo un aumento a los 25 días. La presencia de estructuras embriogénicas se observó entre los 45 y 60 días de haber sido inducidos, lo que concuerda con lo reportado con Cai *et al.* (1999) en otros cultivares de papaya. En el caso de los embriones cigóticos que se encontraban en el medio control (libre de reguladores de crecimiento), no se observó formación de callos y en algunos casos se presentó la germinación de estos. Tal como en el experimento de Fitch y Manshardt (1990), quienes reportan que los embriones cigóticos permanecieron inactivos o germinaron en el medio libre de reguladores de crecimiento exógeno, con lo que los niveles endógenos de auxinas son suficientes para inducir la germinación.

Posteriormente, se transfirieron los callos a medio de cultivo sin regulador de crecimiento durante 4 semanas, lo que dio paso a la formación y proliferación de estructuras embriogénicas globulares, torpedo y cotiledonares. Estos resultados son similares a los reportados en el protocolo de Cai *et al.* (1999). También son consistentes con los resultados obtenidos por Malabadi (2011), con la variedad Honey dew, quien reportó el 71% de embriones en estadio globular y cotiledonar, con el medio de maduración libre de reguladores de crecimiento.

Se realizó un análisis estadístico a los resultados obtenidos del conteo de embriones a 4 semanas de cultivo en el medio de maduración. De acuerdo con este análisis la mejor respuesta se obtuvo con el tratamiento usando 10 mg/L de 2,4-D con 93% de formación de embriones. Cabrera-Ponce *et al.* (1995), reportaron un protocolo eficiente de embriogénesis somática utilizando 10 mg/L de 2,4-D en un sistema de transformación genética. En concordancia, Cai *et al.* (1999) también utilizaron una concentración de 10 mg/L de 2,4-D, misma que fue utilizada por Gutiérrez-Rosati *et al.* (2006), y demostró ser la concentración apropiada para inducir embriogénesis somática, llegando a presentar un 90% de formación de callos embriogénicos. Posada *et al.* (2007), reportaron mayor formación de embriones somáticos con una concentración de 5 mg/L de 2,4-D. En el análisis estadístico, nosotros también encontramos que la concentración de 5 mg/L de 2,4-D es mejor tratamiento para lograr una adecuada embriogénesis somática en *C.*

papaya en cv. Maradol, con una respuesta de 82% en la formación de embriones somáticos totales. Parecido a lo que Arora y Singh reportaron en 1978, quienes obtuvieron una producción de callo embriogénico de 100% con 5 mg/L de 2,4-D.

Para el caso de Picloram, el mejor tratamiento fue el que contenía 5 mg/L, mismo que presentó 66% de embriones somáticos totales, parecido a los resultados de Fitch y Manshardt (1990), quienes utilizaron como suplemento para el medio de inducción agua de coco, así como BA, TDZ, 2,4-D y Picloram. Reportaron que entre 49 a 62% de los embriones cigóticos de las variedades Sunrise, Sunset y Waimanalo produjeron de 2 a 20 embriones somáticos con el tratamiento de 5 mg/L de 2,4-D, siendo los tratamientos con TDZ, agua de coco y BA, inhibitorios para la embriogénesis somática, en el caso de Picloram se observó producción de callos embriogénicos a partir de concentraciones más altas (10, 15 y 25 mg/L).

Con el regulador de crecimiento Dicamba, el mejor resultado fue de 77% de embriones somáticos con el tratamiento de 5 mg/L, se ha reportado el uso de este regulador en la embriogénesis somática de otras especies. Algo similar a estos resultados fue reportado por Gray y Conger (1985), que lo usaron en cultivos de *Dactylis glomerata* a una concentración de 6.6 mg/L y obtuvieron estructuras típicas de los embriones, desde globulares hasta las etapas completamente desarrolladas, a seis semanas después de la inoculación. También Hunsinger y Schauz (1987), realizaron experimentos con Dicamba en el cultivo de *Triticum aestivum* L. a una concentración de 1 mg/L obteniendo el 87% de callo embriogénico.

Se ha señalado que el 2,4-D tiene un papel importante en la iniciación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros. El éxito generalizado en el uso de embriones inmaduros para producir embriones somáticos también está documentado por Williams y Maheswaran (1986), que enumeraron alrededor de 20 especies dicotiledóneas en las que los embriones somáticos han sido producidos a partir de embriones cigóticos inmaduros.

En conclusión, de acuerdo con el análisis de los datos obtenidos de la inducción de embriogénesis somática en este trabajo, el regulador de crecimiento con una mejor respuesta en la obtención de embriones somáticos es el 2,4-D. Siendo 10 mg/L la mejor concentración, seguido por 5 mg/L de este mismo regulador y de Dicamba. En cuanto al

efecto de los reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de los embriones somáticos, también se encontró que el 2,4-D a una concentración de 10 mg/L fue el mejor tratamiento, mostrando el mayor número de embriones somáticos en estadio cotiledonar.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS *in silico* DE GENES HOMÓLOGOS *SERK* EN *Carica papaya*

3.1 INTRODUCCIÓN

Los genes *SERK* codifican para proteínas transmembranales con un dominio extracelular y un dominio cinasa intracelular, pertenecientes a la familia llamada RLK (Receptors Like Kinase). Se caracterizan por la presencia de un péptido señal (SP), una cremallera de leucina (LZ), cinco repeticiones ricas de leucina (LRR), un motivo Serina-Prolina-Prolina (SPP) el cual ha sido sugerido que actúa como bisagra para proporcionar flexibilidad a la región extracelular de la proteína, un solo motivo transmembranal (TM), el dominio de cinasa citoplásmica que contiene un motivo serina/treonina y un dominio C-Terminal (Figura 3.1) (Tichtinsky *et al.*, 2003). Los genes *SERK* pertenecen a una superfamilia que cuenta con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK) mismas que juegan un importante papel en la interacción de proteína-proteína (Aan den Toorn *et al.*, 2015).

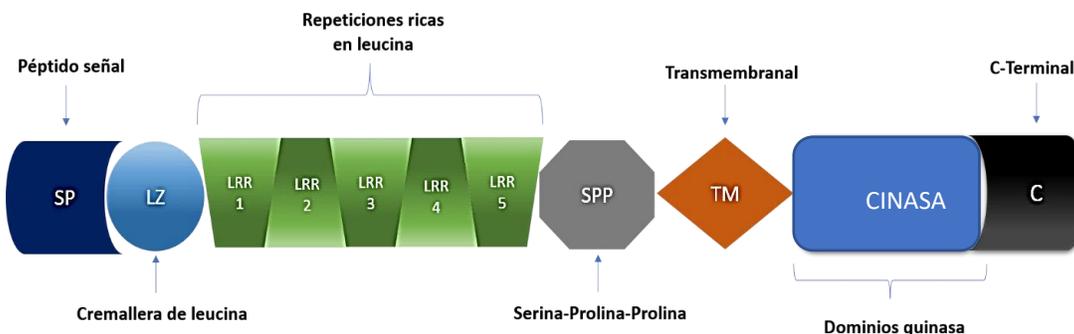


Figura 3.1. Estructura proteica del gen *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), perteneciente al grupo con repeticiones ricas en leucina de la familia de receptores tipo

Entre las funciones de los genes *SERK*, se encuentran la regulación de crecimiento vegetal, desarrollo de raíz, fertilidad masculina, desarrollo y movimiento estomático, así como respuesta inmune.

Para ambos genes de *A. thaliana*, *AtSERK1* y *AtSERK2*, se reporta que median las vías de señalización de esporogénesis masculina, separación de flores y órganos (Albrecht *et*

al., 2005; Lewis *et al.*, 2010; Mantelin *et al.*, 2011), señalización de brasinoesteroides para *AtSERK1*, *AtSERK3/BAK1* y *AtSERK4* (Li *et al.*, 2002; Nam y Li, 2002; Karlova *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Albrecht *et al.*, 2008), también para *SERK3/BAK1* y *SERK4* señalización de flagelina (Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007) y las respuestas de muerte celular (He *et al.*, 2007; Kemmerling *et al.*, 2007). En el caso del gen *SERK5* no tiene función registrada y se cree que podría ser un pseudogen (He *et al.*, 2007).

El primer gen *SERK* descubierto se clonó de un cultivo de células en suspensión de zanahoria donde se encontró su expresión en células competentes, es decir, células en transición entre células somáticas y los estados embriogénicos. Se utilizó hibridación *in situ* para demostrar la expresión de *DcSERK* (Accesión U93048.1), ésta se detectó por primera vez en células individuales de cultivos embriogénicos inducidos con 2,4-D durante 7 días. Sin embargo, la expresión continuó aumentando hasta la etapa de embrión somático globular y luego bajó. Se observó un patrón de expresión de *SERK* similar durante el desarrollo de embrión cigótico y durante embriogénesis somática, lo que sugiere que se activa la misma vía de señalización de *SERK* tanto en la embriogénesis somática como en la cigótica (Schmidt *et al.*, 1997).

En este capítulo analizamos las secuencias de *C. papaya* que pudieran presentar los dominios característicos de la familia de genes *SERK*, para determinar el número total de miembros de esta familia que se encuentren en el genoma de *C. papaya*. Así mismo, se analizará la distancia evolutiva entre los genes *SERK* que se encuentren en el genoma de *C. papaya* contra los reportados en *A. thaliana*. También se realizará el diseño de los oligonucleótidos de los genes homólogos para ser analizados en tejidos provenientes de embriogénesis somática.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Secuencias de genes *SERK*

Mediante el uso de la herramienta BLAST (versión 2.8.0), se realizó un tblastx en el genoma de *Carica papaya* (NCBI: DS981520) a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes *SERK* reportados para *Arabidopsis thaliana* en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con el fin de encontrar posibles homólogos de esta familia de genes, se seleccionaron las secuencias con mayor porcentaje de identidad para ser traducidas a proteínas usando FGENESH (<http://www.softberry.com/berry.phtml>).

Con las secuencias de nucleótidos traducidos se realizó un blast local de los genes encontrados en *C. papaya* contra las especies *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK*) seleccionando las de mayor porcentaje de identidad, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias proteicas utilizando el algoritmo Clustal W con un máximo de 1000 repeticiones en MEGA (versión 7, Kumar *et al.*, 2016) con el fin de obtener su relación filogenética. Así mismo se realizó una matriz de distancia entre los posibles homólogos de los genes *SERK* para ambas especies.

Con los alineamientos se construyó un árbol filogenético, la distancia filogenética se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de la matriz Jones Taylor Thornton (JTT) (Jones *et al.*, 1992) con el bootstrap inferido a partir de 1000 repeticiones utilizando MEGA 7.

3.2.2 Diseño de oligonucleótidos para homólogos de genes *SERK* encontrados en *Carica papaya*

Con las secuencias de los genes *SERK* que se encontraron en el genoma de *C. papaya* se trabajó para el diseño de oligonucleótidos utilizando Primer Premier versión 3.0, evitando la formación de dímeros entre ellos, con una longitud de 20 a 24 pb y un amplicon de 150 a 250 pb, posteriormente se alinearon con MEGA 7 las secuencias de los genes *SERK* 3 y 2 con los oligonucleótidos correspondiente para cada caso con el fin de validar su posición en la secuencia de los genes.

Se realizó el diseño de dos pares de oligonucleótidos para cada uno de los genes con la finalidad de probar combinaciones entre ellos en el caso de ser necesario, con el software Primer Premiere versión 3.0. También fueron contempladas las longitudes necesarias para ser utilizados en los análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR), y se solicitaron a la casa comercial Sigma Aldrich.

La validación de los oligonucleótidos se llevó a cabo realizando un gradiente de temperatura de 57 a 61° C para cada uno de los pares diseñados, mediante PCR lo cual permitió identificar la temperatura adecuada de amplificación para analizar su expresión. Los productos de PCR se observaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb, se corrió a 75 V y 400 mA durante 55 minutos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Secuencias de genes *SERK* en *C. papaya*

A partir de las secuencias de los genes *SERK* reportados para *A. thaliana*, se obtuvieron 7 posibles secuencias homologas en *C. papaya* (Cuadro 3.1), a partir de las cuales se realizó un árbol filogenético (Figura 3.2).

Cuadro 3.1. Secuencias de la familia de genes *SERK* en *C. papaya* encontrados y seleccionados mediante la herramienta BLAST.

Description	Max score	Total score	Query score	E value	Ident	Accesión
Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 2 (<i>C. papaya</i>)	350	1004	50%	5e-133	82.46%	XP_021896015.1
Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (<i>C. papaya</i>)	350	1003	50%	6e-133	82.46%	ABS32228.1
Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (<i>C. papaya</i>)	350	1002	51%	8e-133	82.46%	ABS32233.1
Brassinoesteroid Insensitive 1-Associated Receptor Kinase 1 (<i>C. papaya</i>)	331	796	46%	5e-127	77.73%	XP_021886956.1
Protein NSP-INTERACTING KINASE 2 (<i>C. papaya</i>)	249	582	45%	8e-91	60.95%	XP_021897772.1
Probable LRR Receptor-Like Serine/Threonine-Protein Kinase At5g10290 (<i>C. Papaya</i>)	253	574	42%	6e-94	60.02%	XP_021887081.1
Protein NSP-INTERACTING KINASE 3 isoform X2 (<i>C. papaya</i>)	248	545	31%	1e-92	62.02%	XP_021895835.1

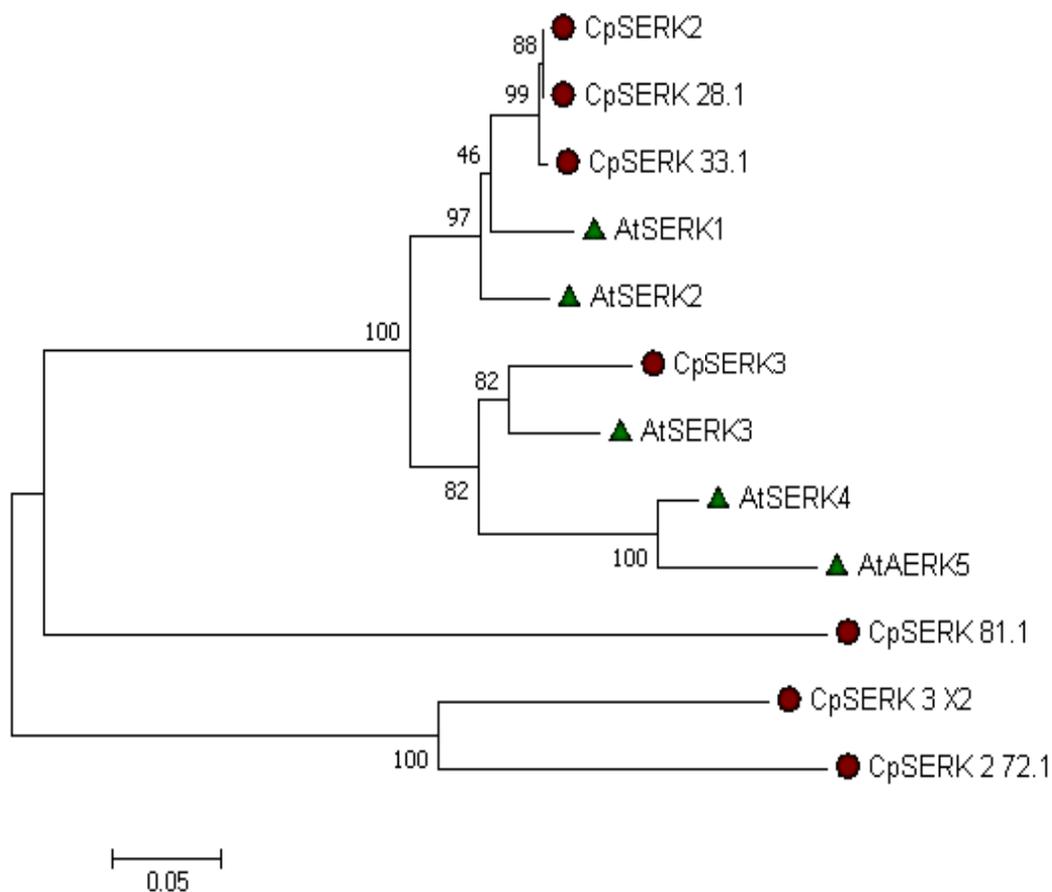


Figura 3.2. Relación filogenética de los genes *SERK* reportados para *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK*) y *Carica papaya* (*CpSERK*). La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo en la matriz Jones Taylor Thornton (JTT). El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1000 repeticiones.

Sin embargo, después de observar la manera en que se agrupaban las secuencias de *C. papaya* con las reportadas para *A. thaliana*, se realizó una matriz de distancia y un árbol filogenético con lo que se decidió trabajar con las dos posibles secuencias homologas a *AtSERK2* y *AtSERK3*, de *C. papaya* que presentaban mayor cercanía evolutiva y porcentaje de identidad a las de *A. thaliana* (Figura 3.3).

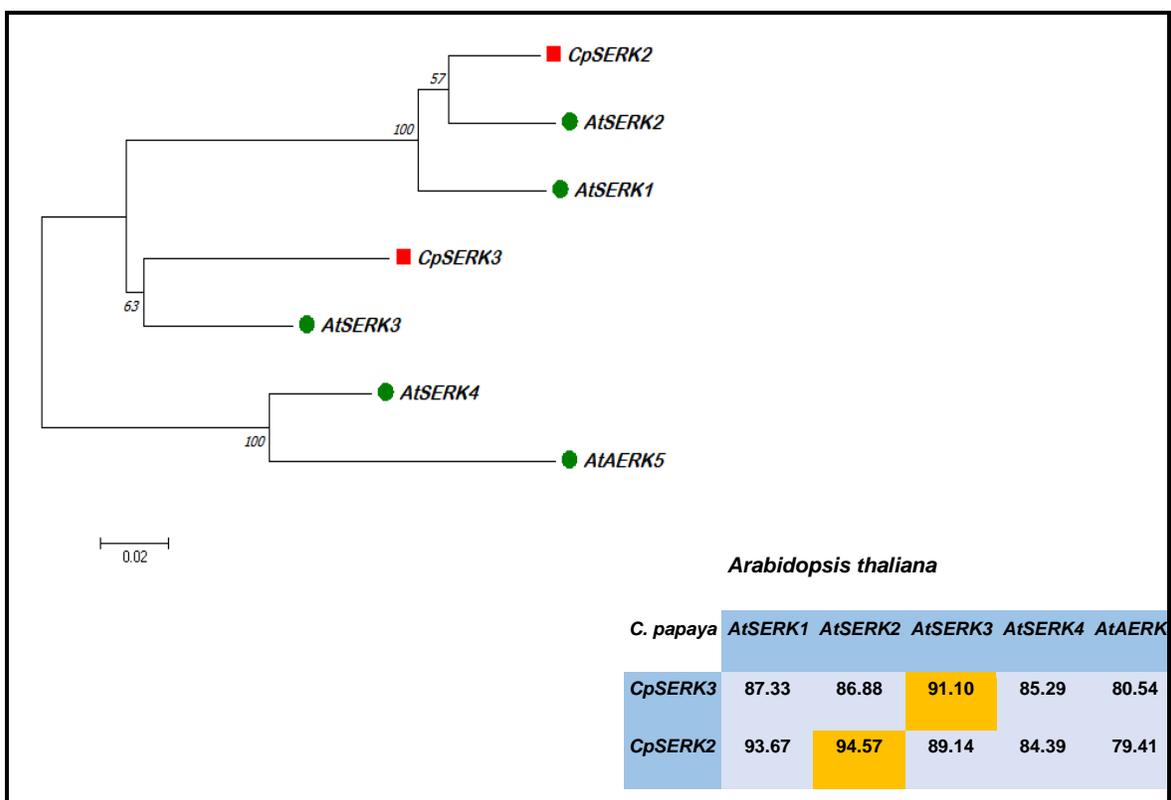


Figura 3.3. Relación filogenética de los genes *SERK* entre *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK*) (círculo verde) y *Carica papaya* (*CpSERK*) (cuadro rojo) y matriz de distancia entre los genes *SERK* de ambas especies. En la matriz se encuentra sombreada la distancia evolutiva entre los homólogos

Del alineamiento con las secuencias de proteínas de los genes *SERK* correspondientes a ambas especies, se obtuvo la identificación de las regiones conservadas entre ellas, así como la localización de los dominios característicos de esta familia de genes (Figura 4.4), se seleccionaron los dos genes encontrados en *C. papaya* para el análisis de su expresión durante el proceso de embriogénesis somática. En el alineamiento se observan el dominio N-terminal, péptido señal (SP, marcado con flecha roja), la cremallera de leucina (LZ, marcado como flecha verde) y las repeticiones ricas en leucina (RLLs, marcado con cinco flechas azules) se encuentran en la región extracelular, el motivo Serina-Prolina-Prolina (SPP marcado en flecha azul celeste), que también se localiza en la región extracelular, el dominio transmembranal (Tm, flecha en color negro) mientras que los dominios cinasas (flechas en color morado) y C-terminal se encuentran en la región intracelular (flecha en color gris).

Se encontraron diferencias en algunas regiones al comparar las secuencias de los genes *CpSERK* y *AtSERK*, de *C. papaya* y *A. thaliana*, respectivamente.

Péptido señal

En la región del SP correspondiente a *CpSERK2* y *CpSERK3*, se observó la ausencia de los primeros 4 y 5 aminoácidos respectivamente, contrario a lo que se encontró en las secuencias de los genes *AtSERK2* y *AtSERK3*.

Dominio SPP

La mayoría de las diferencias, corresponden al gen *CpSERK3* en la región del motivo serina-prolina-prolina (SPP), donde se encontró un cambio en los aminoácidos 204 y 208, presentando en ambos residuos, un aminoácido N (Asparagina) para *CpSERK3* mientras que para el gen *AtSERK3* se observa el aminoácido (T) treonina en las mismas posiciones.

También se pudo observar un GAP del aminoácido 233 al 235 en la secuencia de *CpSERK3* en la región que comprende el dominio SPP, cabe mencionar que este dominio es distintivo de esta familia de genes.

Dominio C-Terminal

La diferencia más notable se encontró en el dominio C-Terminal de este mismo gen en comparación al gen de *A. thaliana*. En la secuencia correspondiente a *CpSERK3* existe un GAP desde el aminoácido 584 hasta el 640, dejando a este gen sin el dominio C-Terminal, característico de esta familia. Estos cambios en las secuencias podrían indicar distinciones únicas para la familia de genes *SERK* en *C. papaya*.

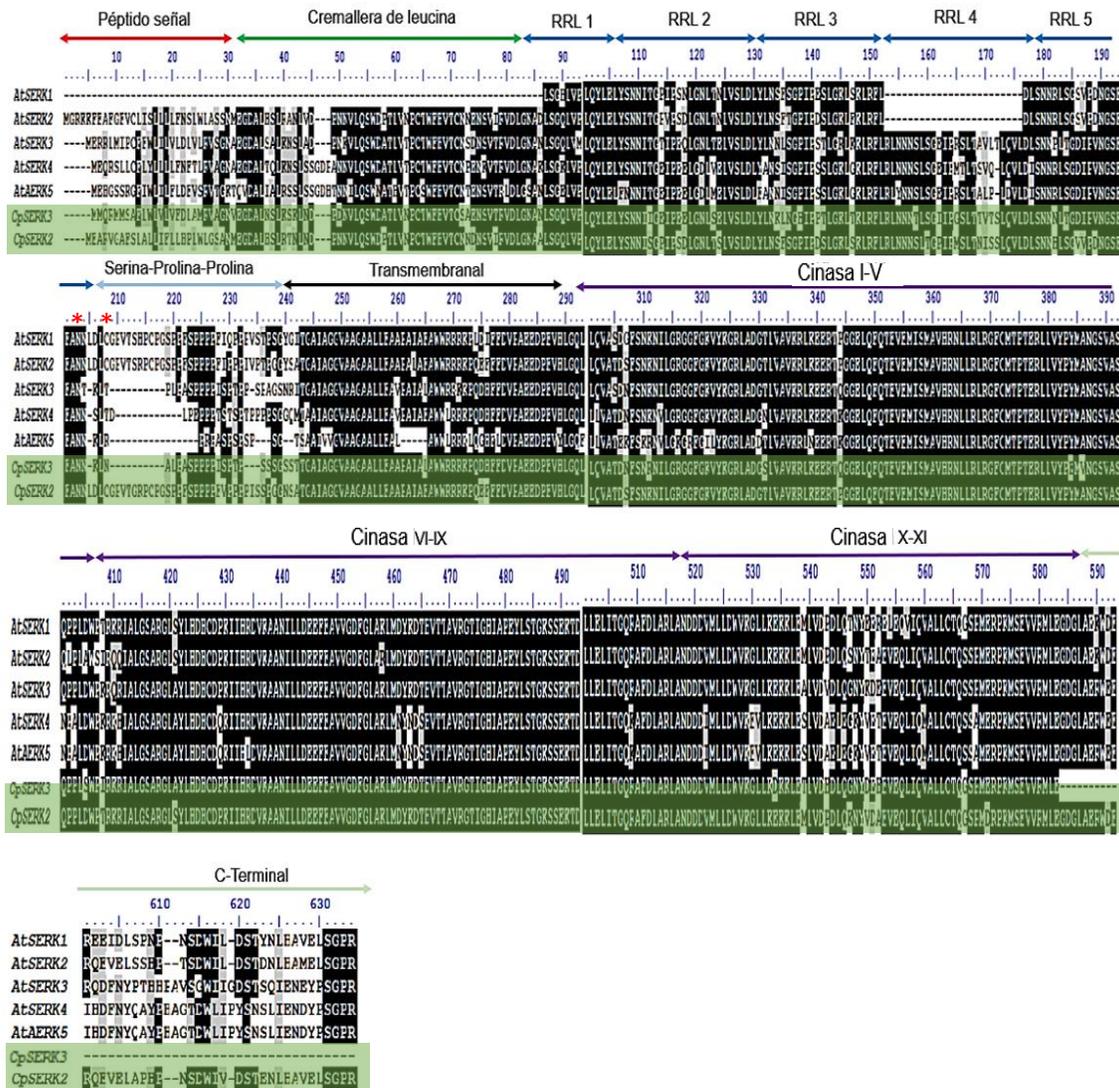


Figura 3.4. Alineamientos de las secuencias de proteínas de genes *SERK* reportados para *A. thaliana* y *C. papaya* (en verde), donde se pueden observar sombreadas en color negro las regiones conservadas entre ellas, las sombreadas en color gris son regiones específicas para cada especie. Se indican las regiones correspondientes y características a la estructura (motivos) de la proteína *SERK* con flechas y el nombre correspondiente a cada una.

3.3.2 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos con el software Primer Premiere versión 3.0 para cada gen seleccionado para el análisis de expresión tomando en cuenta que se usaran tanto para PCR punto final como para PCR en tiempo real, por lo tanto, se obtuvieron 4 pares de oligonucleótidos que van de longitudes de 20 a 24 pb y amplicones de 150 a 181 (Cuadro 3.2).

Cuadro 3. 2. Oligonucleótidos diseñados para los genes *CpSERK3* y *CpSERK2* para el análisis de expresión durante embriogénesis somática de *C. papaya*.

Gen		Longitud (pb)	Región (pb)	Tm Prom	Ampl Tm	Amplicon
<i>SERK3</i>	F1	22	1199-1220	61	80	181
	R1	23	1357-1379	61		
	F2	22	1236-1257	59	78	150
	R2	21	1365-1385	59		
<i>SERK2</i>	F1	20	1519-1538	60	78	151
	R1	20	1650-1669	59		
	F2	24	1641-1664	59	78	151
	R2	23	1769-1791	60		

Cada uno de los pares de oligonucleótidos se validaron con un gradiente de temperatura que iba de 57 a 61° C, tomando en cuenta las mínimas y máximas temperaturas promedio con las que fueron diseñados (Figura 3.5). De los resultados obtenidos se seleccionó el segundo par para cada uno de los genes debido a que se observó mayor amplificación de estos, y se eligió la temperatura de 59° C para trabajar con ellos en los análisis de expresiones. También se pudo observar que amplificaron al tamaño esperado, es decir, a 150 pb.

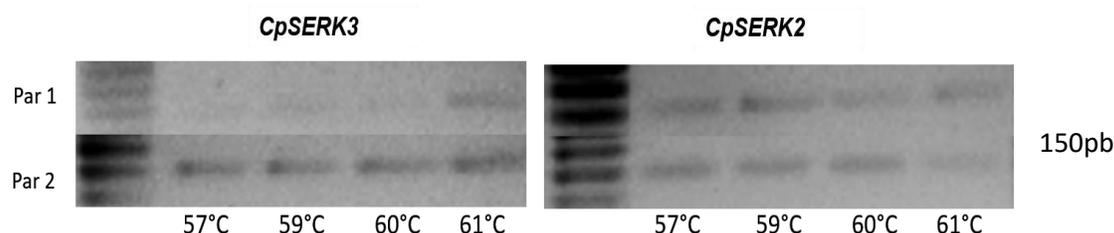


Figura 3.5. Extensión de los genes *CpSERK3* y *CpSERK2*. Gradiente de temperatura de los oligonucleótidos diseñados para la expresión de los genes *CpSERK3* y *CpSERK2*, tomando en cuenta las temperaturas promedio con que se diseñaron. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 50 pb. Par 1: primer juego de oligonucleótidos Par 2: segundo juego de oligonucleótidos Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se indica el tamaño de la banda (150 pb).

3.4 DISCUSIÓN

En *C. papaya* no se había realizado un análisis de los genes *SERK* para identificar su papel en la embriogénesis somática o en procesos fisiológicos. Para *A. thaliana* se han reportado 5 integrantes de esta familia de genes (Hecht *et al.*, 2001) por lo cual se eligieron estos para realizar una búsqueda de sus posibles homólogos en el genoma de papaya reportado en la base de datos del NCBI (Ming *et al.*, 2008). De esta búsqueda, se obtuvieron 7 posibles homólogos de acuerdo con su porcentaje de cobertura y de similitud, sin embargo, solo dos se eligieron de acuerdo con su homología, siendo estos los más cercanos evolutivamente. Se trabajó con estos genes debido a que presentaron las regiones conservadas correspondientes a las repeticiones ricas en leucina, el dominio serina-prolina-prolina, la cremallera de leucina y los dominios cinasa (Tichtinsky *et al.*, 2003). Siendo estos los dominios más representativos y que dan actividad a esta familia de genes de acuerdo con lo que se reporta para otras especies como *Momordica charantia* (Talapatra *et al.*, 2014), *Triticum aestivum* (Singla *et al.*, 2008), *Oryza sativa* (Singla *et al.*, 2009) y *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), con las que guardan similitud entre estos dominios conservados.

En el genoma de *C. papaya* se encontró una secuencia que presentaba 87 % de identidad con el gen *AtSERK1*, sin embargo, se encontró mayor similitud con los genes *AtSERK2* y *AtSERK3*, todos correspondientes a *A. thaliana*. Los genes *SERK* encontrados en *C. papaya* fueron el *CpSERK2* con un porcentaje de identidad con el gen *AtSERK2* de 94.57% y el gen *CpSERK3* que tiene un porcentaje de identidad de 91.10% con el gen *AtSERK3/BAK1*.

Debido a que *A. thaliana* y *C. papaya*, forman parte del orden de las Brassicales, se han realizado diversos estudios y comparaciones a través de los que se ha encontrado una notable cercanía evolutiva entre *C. papaya* y *A. thaliana* (Carvalho *et al.*, 2015). Sin embargo, en el caso de los genes *SERK* existe una proporción menor de los miembros de esta familia en el genoma de *C. papaya*. Esto es probablemente debido a que la cantidad de genes *SERK* en papaya tienen una función más precisa y no tan redundante como lo es en el caso de *A. thaliana*, especie para la que se ha reportado que tanto el gen *SERK1* y *SERK2* están involucrados en los mismos procesos biológicos y fisiológicos, tales como

la fertilidad masculina, desarrollo y movimiento estomático, así como en el desarrollo de órganos reproductivos (Albrecht *et al.*, 2005; Colcombet *et al.*, 2005).

Dominio SPP

Se compararon los alineamientos realizados con las secuencias encontradas en el genoma de papaya y las reportadas para *A. thaliana* contra los alineamientos reportados para *McSERK* (Accesión XP_022155852.1), se observó que, en las tres especies, las secuencias *CpSERK*, *AtSERK* y *McSERK*, mantenían las mismas regiones conservadas, así como los dominios característicos de la estructura proteica. Con estas características se pudo validar que las secuencias encontradas en el genoma de papaya corresponden a homólogos de genes *SERK*. Una de las características más distintivas de las proteínas *SERK* es la presencia de un motivo SPP (Serina-Prolina-Prolina) que varía entre especies, esto las diferencias de otros receptores de tipo cinasa (RLK) (Albrecht *et al.*, 2008). Esta característica fue observada en *Momordica charantia* L. (Talapatra *et al.*, 2014). La proteína *SERK* está compuesta por un dominio SPP el cual se ha propuesto que actúa como bisagra para proporcionar flexibilidad a la región extracelular de la proteína (Hecht *et al.*, 2001). En el dominio SPP correspondiente al gen *CpSERK3* se encontraron también cambios en los aminoácidos 204 y 208 en los cuales se observa el aminoácido N mientras que en el gen *AtSERK3* se encuentra el aminoácido T en las mismas posiciones. En este mismo dominio, se observa un GAP en la región 233-235 del gen *CpSERK3*, misma que no está presente en la secuencia de *AtSERK3*. Confiriendo de este modo características distintivas para esta especie

Regiones LZ y LRRs

En el caso la región que corresponde a las repeticiones ricas en leucina número 4 en *CpSERK2*, el gen *AtSERK2*, presenta un GAP de la posición 153 a 176, que no existe en el gen *CpSERK2*. Schmidt *et al.* (1997) propusieron que los dominios LRR juegan un papel importante en la interacción proteína-proteína.

Dominio C-Terminal

Para el caso de los genes *CpSERK* encontrados en *C. papaya*, específicamente en el gen *CpSERK3*, se observaron diferencias en los alineamientos correspondientes al dominio C-Terminal. En el caso de la secuencia que corresponde al gen *CpSERK3* de papaya, se

observó un GAP de la posición 584 a 640; posición en la que el dominio C-Terminal se presenta en esta familia de genes y en las secuencias de *A. thaliana*. Este GAP deja a este gen carente del dominio C-Terminal característico de esta familia. Esto puede deberse probablemente a que este gen *CpSERK3* puede estar truncado o no estar completo en el genoma de *C. papaya* cv SunUp reportado en Ming *et al.* (2008).

En conclusión, podemos decir que a diferencia de *A. thaliana* que tiene 5 miembros de la familia de genes *SERK*, *C. papaya* presenta solo dos integrantes de esta familia, el gen *CpSERK2* y el gen *CpSERK3*. Sustentando esta idea con los alineamientos que se realizaron entre *CpSERK* y *AtSERK* entre otras especies, mediante los cuales se pudo visualizar los dominios conservados entre los *SERK* reportados para otras especies y los encontrados en *C. papaya*. Con los alineamientos también se pudo comprobar que los *CpSERK* cuentan con la estructura proteica descrita para esta familia de genes.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES *SERK* MEDIANTE RT-PCR Y qRT-PCR, DURANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Carica papaya L.*

4.1 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática se desencadena por una serie de cascada de señales en la cual participan una gran cantidad de genes y los reguladores de crecimiento juegan un papel importante para estimular estos genes. Los *SERK* están involucrados tanto en la formación de raíces, como en la de embriones ya que son procesos regulados por auxinas (Nolan *et al.*, 2003).

Se ha observado que la expresión de *SERK* desempeña un papel importante en el proceso de señalización para la formación de embriones, es decir durante las primeras etapas de la embriogénesis somática (Salaj *et al.*, 2008). Existe el reporte de la presencia de genes *SERK* en especies como *Cocos nucifera* (Perez-Nuñez *et al.*, 2009), *Musa acuminata* (Huang *et al.*, 2010), *Zea mays* (Zhang *et al.*, 2011) y *Cyclamen persicum* (Savona *et al.*, 2012) en las que se ha vinculado su expresión a procesos de la embriogénesis somática.

La expresión de los genes *SERK* ha sido analizada y documentada durante la embriogénesis somática de diferentes especies de plantas. Se ha descrito su papel en la inducción de la embriogénesis somática, se ha demostrado su participación en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, como *Daucus carota* (Schmidt *et al.*, 1997), *Dactylis glomerata* (Somleva *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001; Salaj *et al.*, 2008), *Medicago truncatula* (Nolan *et al.*, 2003), *Ocote acatharinensis* (Santa-Catarina *et al.*, 2004), *Theobroma cacao* (De Oliveira Santos *et al.*, 2005), *Citrus unshiu* (Shimada *et al.*, 2005), *Oryza sativa* (Hu *et al.*, 2005), *Vitis vinifera* (Schellenbaum *et al.*, 2008), *Solanum tuberosum* (Sharma *et al.*, 2008).

Schellenbaum *et al.* (2008), identificaron y analizaron las secuencias de *VvSERK* en *V. vinifera*, las secuencias de *VvSERK1*, *VvSERK2* y *VvSERK3* son muy similares a la de las

proteínas *SERK* registradas para *A. thaliana*. Ellos estudiaron la expresión génica de *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* en callos y embriones somáticos obtenidos de cultivo de anteras de *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay inducidos con los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP. Observaron la expresión de *VvSERK1* en los callos embriogénicos y *VvSERK3* en los embriones.

En el presente capítulo, se analizaron los niveles de expresión de los genes *SERK* en *C. papaya* durante el proceso de inducción de embriogénesis somática, utilizando 2,4-D como regulador de crecimiento en diferentes concentraciones.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Extracción de ARN total del material vegetal

Para llevar a cabo la extracción de ARN total, se tomaron muestras de tejido de diferentes partes de la planta (embrión cigótico, flor, fruto, hoja, tallo y raíz), así como del explante sometido a embriogénesis somática durante la fase inducción (0 y 6 horas, 1 y 21 días) y de embriones somáticos en diferentes etapas de maduración (globular, torpedo y cotiledonar).

El proceso de extracción de ARN total es brevemente descrito a continuación. Se vertió nitrógeno líquido en un mortero que contenía el tejido vegetal (300 a 500 mg dependiendo el tejido), se pulverizó con ayuda de un pistilo de cerámica. Posteriormente se recuperó el material pulverizado en un tubo de 2 mL y se adicionó 1 mL de Trizol™ Reagent por cada 50-100 mg de tejido, se homogenizó con la ayuda de vortex. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para completar la disociación de las nucleoproteínas, posteriormente se agregó 200 µL de cloroformo por cada mL del reactivo de Trizol™ usado para la lisis, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de ser incubado, se centrifugó durante 15 minutos a 13,000 rpm a 4° C, la mezcla se separó en una fase inferior de color rojo (fenol) correspondiente al cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora; esta fase acuosa contenía el ARN y fue transferida a un nuevo tubo.

Para la precipitación del ARN se agregaron 500 μ L de isopropanol a la fase acuosa por mL de reactivo Trizol™ usado para la lisis, se agitó dando golpes suaves al tubo con el dedo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. En seguida se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm a 4° C, el precipitado de ARN total formó una pastilla blanca en el fondo del tubo y con la ayuda de una micropipeta se desechó el sobrenadante.

Posteriormente se procedió a lavar la pastilla, primero se re-suspendió en 500 μ L de etanol al 75% y se agitó ligeramente dando golpes al tubo con el dedo para homogenizar, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4° C, en seguida se desechó el sobrenadante con una micropipeta (el lavado con etanol se realizó dos veces). Se dejó secar el tubo en una campana de flujo laminar durante 10 minutos.

El ARN total fue resuspendido en 30 μ L de agua ultra pura y almacenado a -80° C. La concentración y calidad del ARN fue determinada con la ayuda de un NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA).

La integridad de las bandas se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, se cargó 1 μ L de ARN mezclado con 1 μ L de buffer de carga, la electroforesis se corrió a 90 V durante 30 minutos. Se visualizó las bandas ribosomales integras 28S y 18S.

4.2.2 Síntesis de ADNc

El ARN resultante se trató con el kit de ADNasa Turbo DNA free™ (Invitrogen). Para cada reacción de 30 μ L de ARN se agregó 3 μ L de buffer TURBO DNase™ 10x y 1 μ L de enzima TURBO DNase™, luego se mezcló suavemente. Se incubó a 37° C durante 25 minutos. Se re suspendió el reactivo de desactivación de ADNasa con el vortex y se agregaron 3 μ L a la reacción, se mezcló bien para ser incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se deslizó el tubo 2 o 3 veces durante el periodo de incubación para re dispersar el reactivo de inactivación de la ADNasa. Seguido de este paso, se centrifugó cada tubo a 13,000 rpm durante 5 minutos para luego transferir el

sobrenadante que contiene el ARN a un tubo nuevo evitando tocar el sedimento del reactivo de inactivación.

La concentración fue determinada con un NanoDrop 2000C, posteriormente la concentración de las muestras fue ajustada a de 500 ng/μL. Para cada reacción se añadió 1 μL de Random Primers (1 μg/mL) y 1 μL de dNTPs (10 mM). Se incubó a 70° C durante 5 minutos, se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos. A cada tubo se agregaron 9 μL de la mezcla que contenían 2 μL de 5x First standard (Invitrogen™), 4 μL de MgCl₂ (25 mM), 2 μL de DDT (0.1 M) y 1 μL de Transcriptasa Reversa. Se incubó con las siguientes condiciones: 25° C (5 min), 42° C (1:45 h) y 70° C (15 min). El ADNc se guardó a -20° C para ser utilizado posteriormente.

4.2.3 Condiciones de RT-PCR

Se realizó la validación de los genes seleccionados con los oligonucleótidos previamente diseñados a partir de secuencias homologas de *SERK3* y *SERK2* encontradas en *C. papaya* (Cuadro 4.1). Para cada caso se utilizaron 8 μL de una mezcla compuesta por 5 μL de buffer 10x PCR, 2 μL de MgCl₂ (50 mM), 0.8 μL de dNTPs, 1 μL de oligonucleótido sentido, 1 μL de oligonucleótido anti sentido, 0.2 de Taq Plimerasa (5 U/ μL Invitrogen), 1.5 μL (500 ng/μL) de ADNc y agua grado molecular necesaria para alcanzar un volumen de 50 μL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti® (Thermo Scientific, USA) en el cual se programaron las condiciones de la siguiente manera: para la desnaturalización inicial 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, para la alineación 60 °C durante 1 min, la extensión a 72 °C por 2 min y la para la extensión final 72 °C durante 5 min. Se utilizó el gen constitutivo EF1α como control positivo.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Se cargó una mezcla de 9 μL de producto y 1 μL de buffer de carga, se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb para validar la longitud del amplicon y se corrió a 75 V durante 55 min. La foto documentación se realizó con un Gel Doc XR+ System (Bio-Rad).

Cuadro 4.1. Secuencia de oligonucleótidos diseñados con la longitud de amplicones esperada.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Long. De amplicón
SERK 3	CTGCTGAAGAGGACCCAGAAGT	AACCATCAGCTAGGCGTCCTT	150 pb
SERK 2	CACTGTGACCCAAAGATCATTAC	CAATTGTACCACGCACAGCAGTA	151 pb

4.2.4 Condiciones de qRT-PCR

Se sintetizó ADNc a una concentración de 300 ng/μL para la validación de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* mediante una curva de calibración, en ambos casos se utilizaron diluciones de 1:2 obteniendo concentraciones de 300, 150, 75, 37.5 y 18.75 ng/μL. Para el gen *CpEF1α* utilizado como gen de referencia, se realizaron diluciones de 1:5 que dieron como resultado concentraciones de 300, 60, 12, 2.4 y 0.48 ng/μL (Cuadro 4.2). Se llevaron a cabo tres réplicas de cada concentración, se incluyó un control negativo el cual contenía agua ultra pura como templado, y uno positivo que contenía ADNc maestro como templado. Para la mezcla de reacción, se agregó a cada tubo 0.5 μL de oligonucleótido sentido y 0.5 μL del anti sentido (10 nM), 3 μL del ADNc de cada dilución, también se adicionó una mezcla que contenía 9 μL de SYBR Green *Master Mix*® (Applied Biosystems™) y 7 μL de agua ultra pura. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Real-Time PCR System mediante el software StepOne™ v2.3. Las condiciones programadas fueron de 95 °C durante 10 min para activación de la enzima, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s para la desnaturalización y 59 °C durante 1 min para el alineamiento y extensión.

Cuadro 4.2. Condiciones de la validación en qRT-PCR de genes a cuantificar y gen control.

Gen	Dilución	Temperatura (°C)	Cantidad de templado (μL)
-----	----------	------------------	---------------------------

EF1α	1:5	60	3
SERK3	1:2	60	2.5
SERK2	1:2	62	2.5

4.2.5 Análisis estadístico de expresiones

Se realizó un análisis estadístico de los niveles de expresión de los genes *CpSERK* en los diferentes tejidos de la planta, así como de las expresiones en los diferentes tiempos de exposición de los explantes a 2,4-D. Los datos obtenidos a partir de la cuantificación de expresión relativa fueron normalizados y posteriormente sometidos a un análisis ANOVA de un factor utilizando el software estadístico Minitab 18, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, con una comparación de medias por el método de Tukey y con una confianza de 95%.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Extracción de ARN total de diferentes tejidos de *C. papaya* tipo Maradol

El ARN total se extrajo a partir de embrión cigótico, hoja, tallo, raíz, flor y fruto, de *Carica papaya*, así como de tejidos obtenidos mediante embriogénesis somática en estadio globular, torpedo y cotiledonar (Cuadro 4.3). Este ARN fue utilizado para las validaciones y expresión de los genes *SERK*.

Cuadro 4.3. Concentración, pureza de ARN extraído y rendimiento ($\mu\text{gRNA/gPF-1}$) de los diferentes tejidos de *C. papaya* tipo Maradol.

Tejido	A260/280	A260/230	RNA (ng/ μL)	Rendimiento $\mu\text{gRNA/gPF}$
Hoja	2.08	1.82	577	273.02
Tallo	2.11	1.89	335	27.34
Raíz	1.91	1.88	456	28.65
Flor	1.94	1.08	721	46.02
Fruto	2.01	1.67	141.7	31.56
Embrión cigótico	1.90	1.63	402.8	64.66
Embrión somático etapa globular	1.91	1.64	741.8	44.51
Embrión somático etapa torpedo	1.92	1.64	933.4	58.31
Embrión somático etapa cotiledonar	1.88	1.42	514.1	55.98

Para el análisis de la integridad de ARN proveniente de los tejidos de embriones somáticos se obtuvieron el par de bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S

(Figura 4.1). Los tejidos embrionarios de los cuales se realizó la extracción de ARN se obtuvieron con el tratamiento de referencia que corresponde a 5 mg/L de 2,4-D para la inducción de embriogénesis somática.

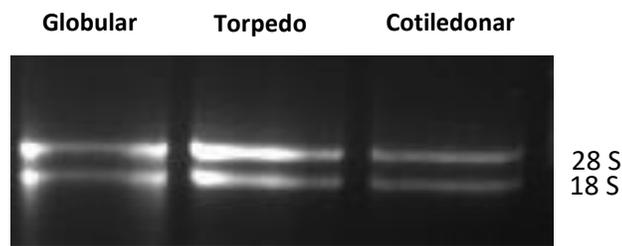
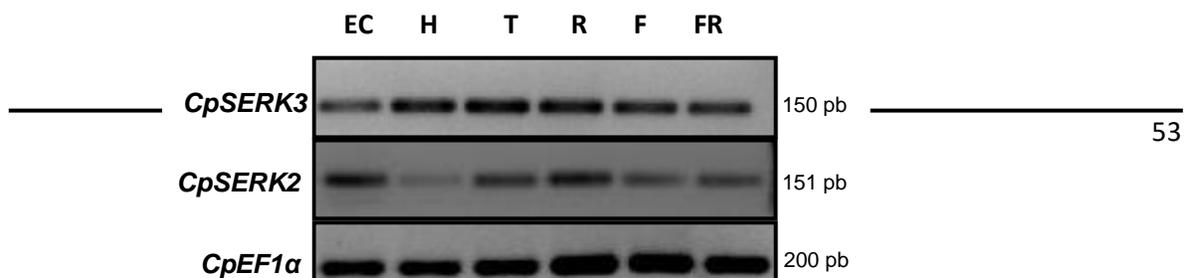


Figura 4.1. Análisis de la integridad de ARN total obtenido de embriones somáticos (globular, torpedo y cotiledonar) de *Carica papaya*. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

4.3.2 Patrones de expresión de los genes *CpSERK* en diferentes tejidos de *C. papaya* tipo Maradol

El ADNc obtenido se utilizó para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos de interés, se obtuvo la expresión basal en los diferentes tejidos de la planta y se generó el amplicon de tamaño esperado (Figura 4.2). El gen *CpSERK3* muestra una intensidad de banda mayor en los tejidos correspondientes a hoja, tallo y raíz. El gen *CpSERK2* presenta un ligero aumento intensidad en los tejidos provenientes de embrión cigótico, tallo y raíz.



Para los tejidos embrionarios, se observó una mayor intensidad de banda en los tejidos correspondientes a embriones somáticos en estadio globular y torpeda tanto para *CpSERK3* como para *CpSERK2* (Figura 4.3). Esta intensidad de banda sugiere que los homólogos de SERK encontrados en el genoma de *C. papaya* pueden estar involucrados en la inducción de embriogénesis somática.

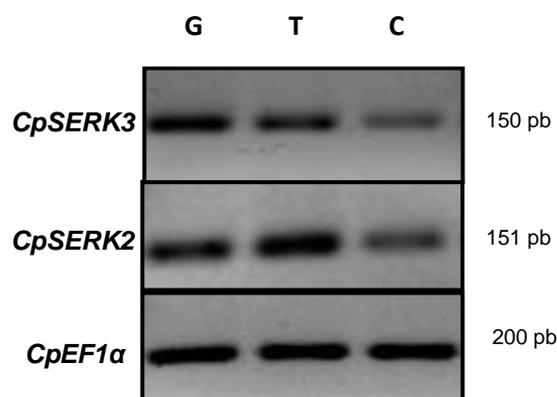


Figura 4.3. Expresión de los genes *CpSERK3* y *CpSERK2* en tejidos embrionarios obtenidos mediante embriogénesis somática de *C. papaya* tipo Maradol expuestos a 2,4-D (5 mg/L). Cada columna corresponde a un tejido en el orden: G globular, T torpeda y C cotiledonar. Se indica el tamaño de cada amplicon del lado derecho del gen. El gen *CpEF1α* fue utilizado como control.

4.3.3 Análisis de la expresión en tiempo real de los genes *CpSERK* en diferentes tejidos de *C. papaya* tipo Maradol

Para la validación, del gen base, se realizó mediante una curva de calibración del gen *CpEF1α* (Elongation Factor 1), usando tejido proveniente de embrión somático en estadio de globular, donde se obtuvo un porcentaje de eficiencia del 92.65% con un valor R2 de 0.97. De la misma validación se generó una curva melting con una tasa de fluorescencia máxima de 34,000 a una temperatura de 81.77 °C. El gen *CpSERK3* se validó con una eficiencia de 97.74% y una R2 de 0.99, con una tasa de fluorescencia de 76,000 a 79.58 °C. En el caso del gen *CpSERK2* se obtuvo la validación con 92% de eficiencia y una R2 de 0.97, con tasa de fluorescencia de 34,000 a 79.23 °C (Figura 4.4).

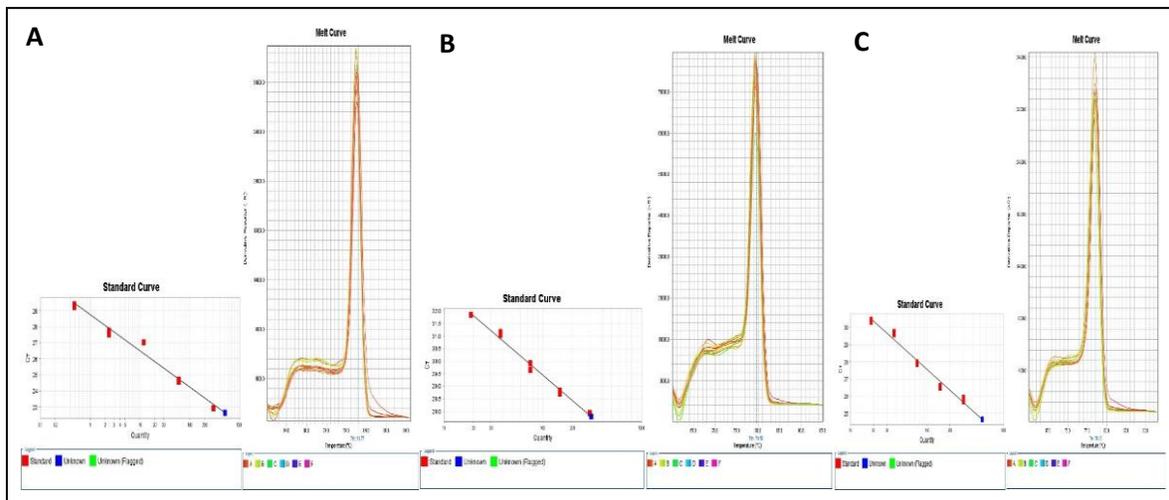


Figura 4.4. Curva Melting y standard de la validación mediante qRT-PCR de los genes a) *EF1α* b) *CpSERK3* y c) *CpSERK2*.

Posterior a la validación tanto del gen de referencia *CpEF1α* como los genes *CpSERK3* y *CpSERK2*, se realizó una cuantificación de la expresión relativa en los diferentes órganos de la planta, así como de los diferentes tiempos de exposición del explante a 2,4-D, para visualizar la actividad de los genes *CpSERK*. Se encontró una mayor expresión relativa de ambos genes *CpSERK3* y *CpSERK2* para los tejidos correspondientes a fruto, embrión somático y flor; sin embargo, en todos los casos el gen *CpSERK3* presenta una mayor diferencia significativa, con respecto al gen *CpSERK2*. El tejido con menor expresión fue el de tallo (Figura 4.5). Esto sugiere la participación del gen *SERK3* en diferentes procesos de diferenciación celular de la planta, así como en el proceso de embriogénesis

somática. Sin embargo, en el caso de EC, y los órganos: tallo, hoja y raíz, se aprecia una mayor o igual expresión de *CpSERK2* que *CpSERK3*. Por lo que *CpSERK3* está más relacionado con tejidos diferenciados.

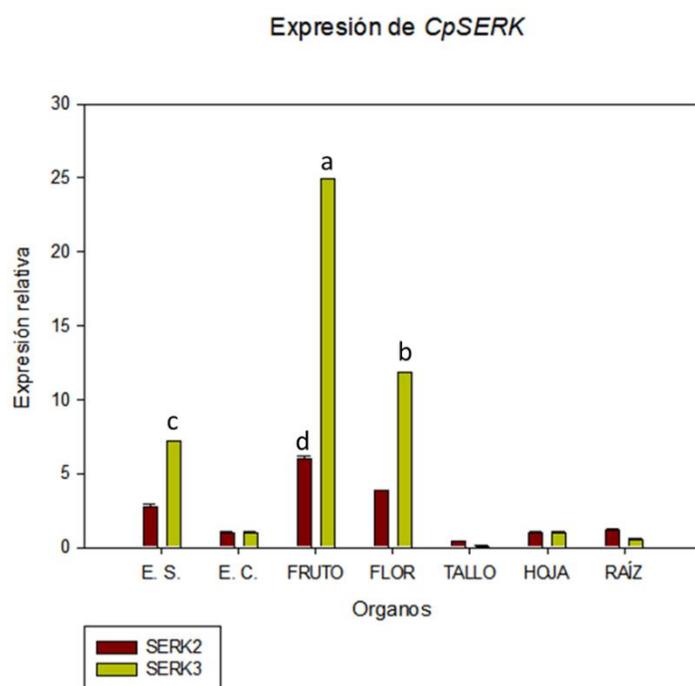


Figura 4CXIV.5. Niveles de expresión relativa de genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en embriones somáticos (E.S) y Embrión cigótico (E.C.), y órganos de la planta: Fruto, Flor, Tallo, Hoja y Raíz de *C. papaya*. Las barras corresponden a la media \pm la desviación estándar y las letras indican las diferencias estadísticas, comparación de medias con el método de Tukey con una confianza de 95%.

Para evaluar la expresión de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en relación con los reguladores de crecimiento, se realizó la cuantificación de la expresión en los explantes expuestos a 10 mg/L de los reguladores: Picloram, 2,4-D y Dicamba durante la etapa de

inducción. Respecto a los reguladores de crecimiento, se observó la mayor expresión relativa *CpSERK3*, en los explantes expuestos a 2,4-D (2.54) seguido de Picloram (2.07). Sin embargo, *CpSERK2* no mostró diferencias en su expresión en respuesta a 2,4-D y Picloram. Por otro lado, la menor expresión de los genes *CpSERK2* (0.84) y *CpSERK3* (0.57) se encontró en los explantes expuestos a Dicamba (Figura 4.6).

Se pudo observar que el gen con mayor expresión en esta evaluación fue el gen *CpSERK3* en tejidos expuestos a 2,4-D y Picloram. Para Dicamba se presentó la menor expresión relativa de ambos genes, en comparación con los otros reguladores ya mencionados, sin embargo, con este regulador se aprecia una mayor expresión de *CpSERK2* (Figura 4.6). Esta evaluación concuerda con los resultados de embriogénesis somática, que sugieren una mayor eficacia en la inducción con el uso de 2,4-D.

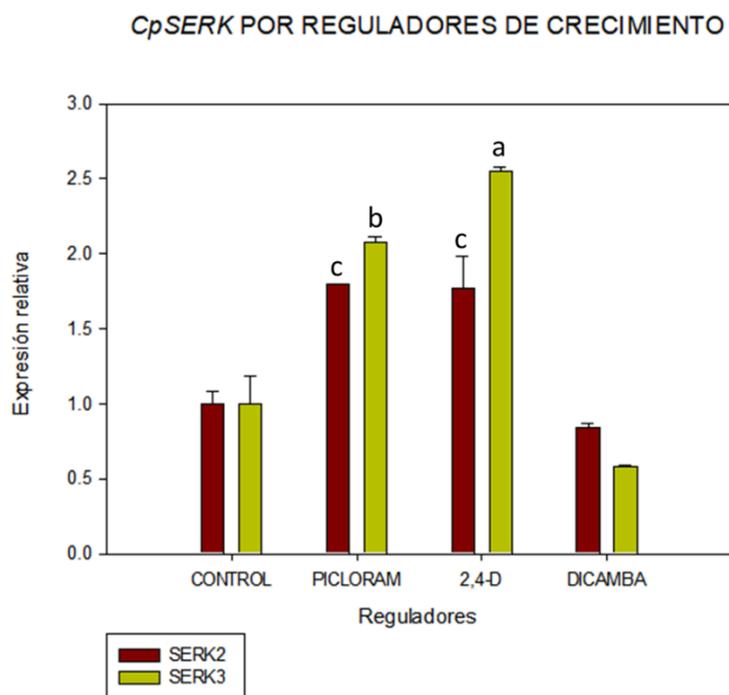


Figura 4.6. Niveles de expresión relativa de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en explantes expuestos a los reguladores de crecimiento: Picloram, 2,4-D y Dicamba, para la inducción de embriogénesis somática. Las barras corresponden al promedio y las líneas de las barras corresponden a la desviación estándar. Las letras indican las diferencias estadísticas, comparación de medias con el método de Tukey con una confianza de 95%.

Tomando en cuenta la relación de expresión relativa de los genes *CpSERK* con la presencia 2,4-D, se cuantificó la expresión a diferentes tiempos de inducción con las concentraciones de 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D utilizadas para la inducción de embriogénesis somática. La máxima expresión de ambos genes fue a las seis horas, en las tres concentraciones de 2,4-D utilizadas, aunque la expresión del gen *CpSERK2* fue solo del 28.19% respecto a la expresión del gen *CpSERK3* con 10 mg/L. Por otro lado, a 5 mg/L el gen *CpSERK2* fue de solo 6.11% del gen *CpSERK3* y en 2 mg/L fue seis veces mayor la expresión del gen *CpSERK3* en relación con la expresión de *CpSERK2*.

El gen *CpSERK3* presentó un aumento en la expresión relativa de acuerdo con el aumento en las concentraciones utilizadas, siendo 10 mg/L la concentración con mayor expresión en los tiempos de inducción seguido por 5 mg/L. *CpSERK2* no guarda la misma relación entre el aumento de concentración y mayor expresión, aunque los niveles de expresión para este gen resultaron menores, también se obtuvo el mayor pico de expresión (28.19%) con 10 mg/L seguido por 2 mg/L de 2,4-D (11%) (Figura 4.7). Con los resultados obtenidos del establecimiento de embriogénesis somática se observa una relación entre la mejor concentración de 2,4-D para la inducción y los niveles de expresión de los genes *CpSERK*. También se puede deducir la actividad de estos genes en etapas tempranas de la inducción de embriogénesis somática de *C. papaya*.

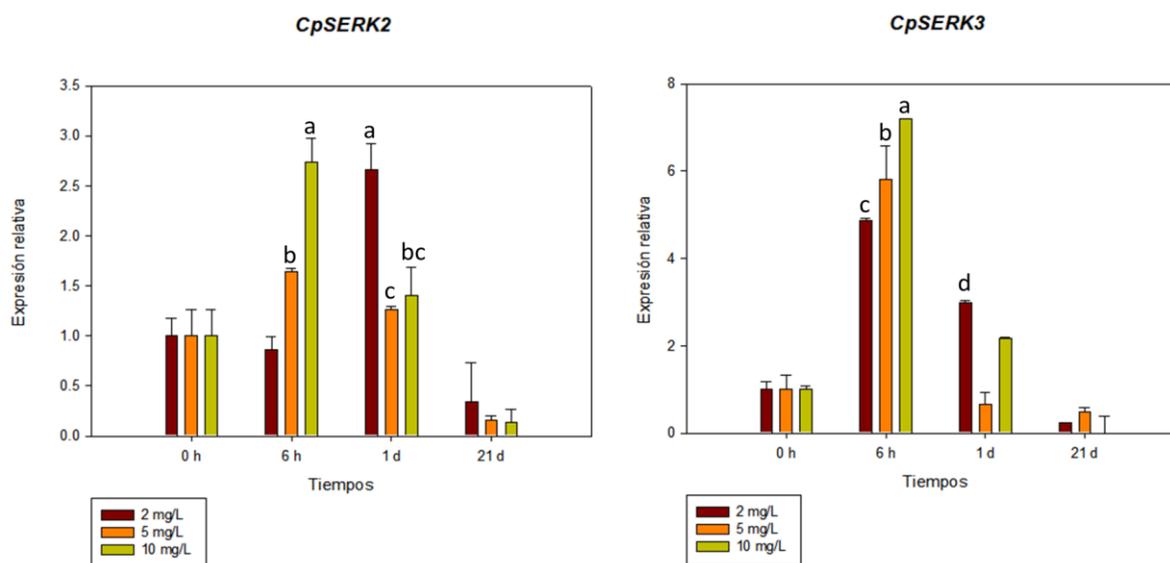


Figura 4.7. Niveles de expresión relativa de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en explantes sometidos a 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D durante 0 horas, 6 horas, 1 día y 21 días de inducción. Las barras indican la media \pm la desviación estándar. Las letras indican los análisis estadísticos, comparación de medias con el método de Tukey con una confianza de 95%.

A partir de los datos obtenidos de las cuantificaciones de expresión relativa correspondiente a las concentraciones de 2,4-D y de los resultados de embriogénesis somática utilizando estas mismas concentraciones, se realizó un análisis de la relación que existe entre ellos. Se comparó el número total de embriones somáticos obtenidos con cada concentración y la expresión relativa que presentaron.

Se observó una tendencia positiva para ambos genes *CpSERK*. De este análisis también se obtuvo una r^2 de 0.85 para el gen *CpSERK2*, lo que demuestra correlación entre los niveles de expresión de este gen durante el proceso de inducción, con el número de embriones obtenidos. Respecto al análisis correspondiente al gen *CpSERK3*, se obtuvo una r^2 de 0.82, en ambos genes se observó una correlación similar entre su expresión relativa y el número de los embriones obtenidos con las concentraciones de 2, 5 y 10 mg/L (Figura 4.8). Sin embargo, los niveles de expresión del gen *CpSERK3* son más altos respecto a los de *CpSERK2* lo que podría sugerir que este es el gen que está más

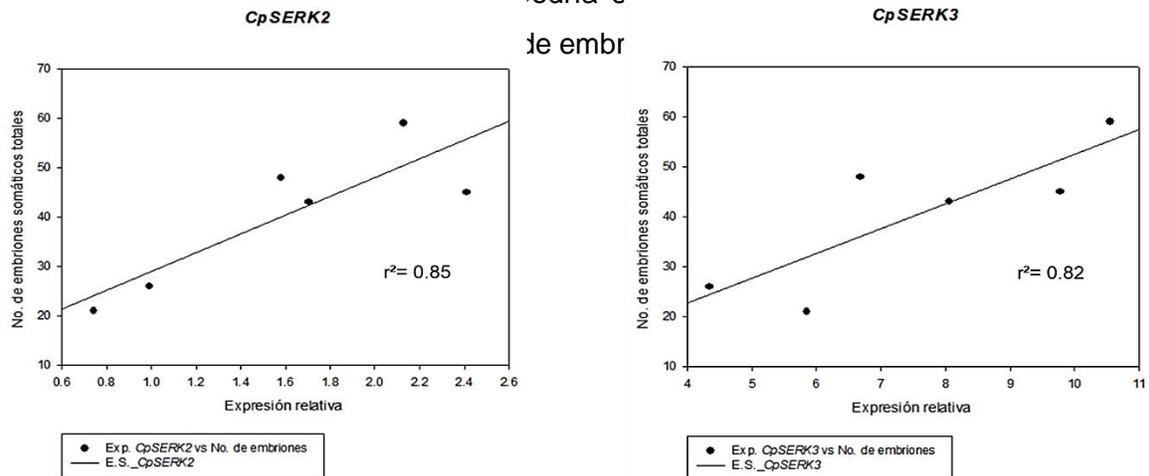


Figura 4.8. Correlación entre el número total de embriones somáticos obtenidos con 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D y el pico máximo de los niveles de expresión relativa correspondiente a los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en los explantes expuestos a estas.

Durante el proceso de la inducción de embriogénesis somática también se realizó un conteo de embriones en estadio cotiledonar obtenidos mediante esta vía, mismo conteo que se comparó con la expresión relativa de los genes *CpSERK*. Esto con el fin de poder saber si existe una relación entre los niveles de expresión de *CpSERK3* y *CpSERK2* y el nivel de desarrollo de los ES (número de embriones desarrollados hasta la etapa cotiledonar).

Se encontró que tanto para el gen *CpSERK2* como para el *CpSERK3* existe una tendencia positiva, es decir, que, al aumentar la concentración de auxina exógena, también hay aumento en la expresión relativa de ambos genes, misma que está asociada con un incremento en el número de embriones en estadio cotiledonar. Sin embargo, con respecto al valor de r^2 (0.70) del gen *CpSERK2* se observó una baja correlación respecto a *CpSERK3*. Lo que podría indicar que este gen se expresa de manera transitoria y quizá en otro estado embrionario se encuentra con un mayor nivel de expresión. No obstante, para el gen *CpSERK3* se encontró una correlación un tanto más alta tomando en cuenta el valor de r^2 (0.78) calculada para este caso, señalando la correlación que existe entre el nivel de expresión de este gen y la presencia de embriones somáticos en estadio cotiledonar (Figura 4.9). De este modo se puede deducir la participación de *CpSERK3* en las etapas tempranas de la inducción de embriogénesis somática y en el desarrollo embrionario con el regulador de crecimiento 2,4-D. Esto, tomando en cuenta la diferencia en el nivel de expresión de *CpSERK3* respecto a *CpSERK2*.

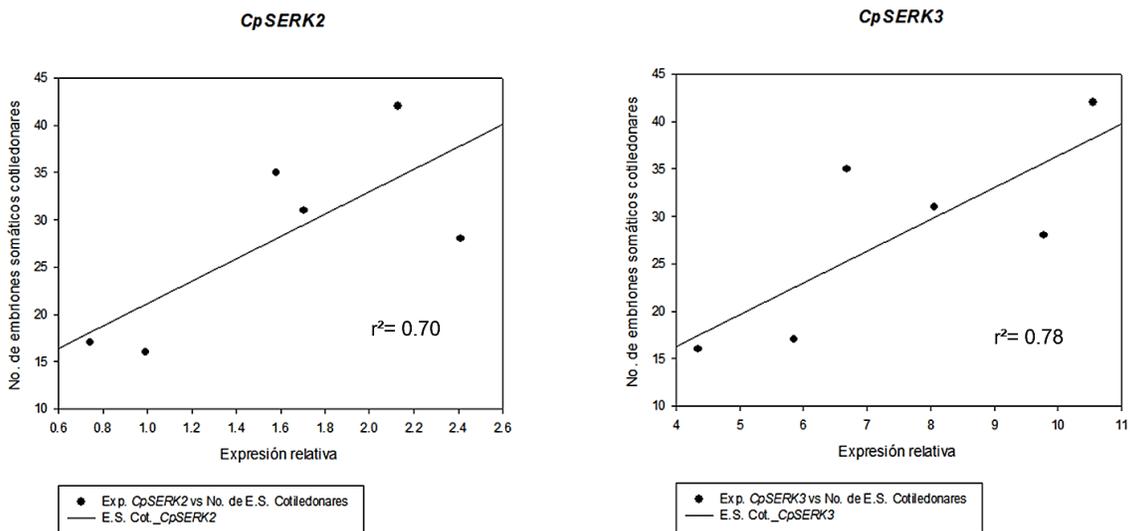


Figura 4.9. Correlación entre el número de embriones en estadio cotiledonar obtenidos con 2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D y el pico máximo de la expresión relativa correspondiente a los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en los explantes expuestos a estas concentraciones.

4.4 DISCUSIÓN

En el análisis inicial de la expresión de punto final en forma basal correspondiente al gen *CpSERK2* en *Carica papaya* hubo una intensidad de banda mayor para los tejidos de tallo y raíz. En *Zea mays* el gen *ZmSERK2* se expresa en los diferentes tejidos de la planta y en tejidos provenientes de callos embriogénicos y no embriogénicos (Baudino *et al.*, 2001). En los tejidos de la planta de *C. papaya* *CpSERK3* presentó una mayor intensidad de banda en los tejidos de hoja, tallo y raíz y ligeramente menor intensidad de banda en flor y fruto según la expresión por PCR en punto final. Pero, el gen *CpSERK3* mostró una mayor intensidad de banda en todos los tejidos evaluados, que el gen *CpSERK2*.

El fruto, flor y los ES, fueron los tejidos y el estadio de desarrollo, que presentaron la mayor expresión relativa de *CpSERK2* y *CpSERK3*, con patrones muy similares, entre ellos. Para el gen *ZmSERK3*, Baudino *et al.* (2001) encontraron una mayor intensidad de banda en los tejidos de hoja, carióspside antes de polinizar y a dos días de ser polinizado, así como en el tejido de meristemo apical. Del mismo modo en *A. thaliana* (Albrecht *et al.*, 2008) reportaron la participación en la fertilidad masculina, del gen *AtSERK1* y *AtSERK2*. Lo que también podría soportar la alta expresión relativa de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3*, encontrada en el tejido proveniente de flor de *C. papaya*. En *Oriza sativa* se identificaron y analizaron la familia de genes tipo *SERK* y *SERL*, demostrando que estos genes se expresan diferencialmente en el desarrollo de semillas y varios tejidos de la

planta (Singla *et al.*, 2009). Esto concuerda con la expresión de los genes *CpSERK* analizados en el presente trabajo, respecto a la alta expresión relativa en los tejidos correspondientes a fruto, y embrión somático. Tanto para el gen *CpSERK2* como para el *CpSERK3* se encontró una mayor expresión en estos tejidos, fruto, flor y ES, mismos que se encuentran en diferenciación y división celular continua. Misma idea que podría soportar la baja expresión de los *CpSERK* en el tejido de embrión cigótico, ya que se encontraba en estado inmaduro (posiblemente con una baja división celular hasta que inicie el proceso de germinación). Es probable que, por este hecho, no presentara alta expresión ya que en ese punto no se encontraba en alta división o diferenciación celular. También se ha reportado que estos genes *SERK* están regulados tanto por auxinas como por brasinoesteroides, lo que indica que pueden realizar funciones redundantes en el desarrollo de la planta. Para *OsSERL2*, *OsSERL3* y *OsSERK2* se presentó un primer pico de expresión, a 2 días de polinización y el mayor pico para todos los casos fue a los 10 días de polinización (Singla *et al.*, 2009).

En los tejidos provenientes de embriogénesis somática se observó que la intensidad de banda tanto para *CpSERK3* como para *CpSERK2* fue mayor en los estadios globular y torpedo. En el estadio cotiledonar, hubo una intensidad de banda menor, lo que concuerda con la baja correlación que se encontró entre la expresión relativa de *CpSERK2* y el número de embriones en este estadio. Durante el cultivo de embriogénesis somática de *D. carota* que fue el primer cultivo del cual se aisló el gen *SERK*, se reportó que el mayor patrón de expresión fue en etapas tempranas del cultivo, es decir, a los tres días de cultivo con 2,4-D (en estadio globular), descendiendo en tejidos sin regulador de crecimiento y tejidos no embriogénicos (Schmidt *et al.*, 1997). Del mismo modo Somleva *et al.* (2000) encontraron en *D. glomerata* L. un patrón transitorio en la expresión del gen *SERK* (Accesión AET86626.2) durante el desarrollo embrionario temprano, hasta la etapa globular. En etapas posteriores del embrión, la expresión estuvo presente en el brote de meristemo apical, escutelo y coleóptilo. En el cultivo de *M. charantia*, Talapatra *et al.* (2014) reportaron un aumento en la expresión de *SERK* durante la fase de iniciación de la embriogénesis somática, la intensidad máxima de la banda se observó en 28 días de edad del callo embriogénico, lo que indica la expresión más alta de *SERK* durante este período de desarrollo. Ellos observaron que el nivel de expresión de *SERK* disminuye con un aumento del período de cultivo de callos y la expresión es menor en callos

embriogénicos completamente maduros (42 días). Similar a lo que se observa en nuestro trabajo respecto a la expresión de *CpSERK3* y *CpSERK2* a los 21 días de cultivo, así como al patrón de expresión obtenido mediante PCR en punto final en el caso del tejido correspondiente al estadio cotiledonar.

Se ha reportado la relación entre el tiempo de cultivo, estados embriogénicos y la expresión de genes *SERK* específicos. Por ejemplo, en *A. thaliana* se realizó la detección histoquímica utilizando la proteína GUS (beta-glucuronidasa) con *AtSERK1* encontrando actividad en embriones somáticos primarios y secundarios, para ambos casos en etapas preglobular y globular pero no en embriones somáticos en estado de corazón y torpedo (Salaj *et al.*, 2008). Singla *et al.* (2009) reportaron de acuerdo con sus investigaciones que *OsSERK2* mostró una expresión específica durante la fase de maduración. Esa evidencia lo hace parecer más específico para la embriogénesis somática que *OsSERK1* en el caso de *O. sativa*. En *P. incisa* se reportó el nivel de transcripción de *PiSERK3* relativamente alto durante el período de inducción, observando un patrón bifásico. Se detectó un primer pico de expresión en las muestras de tejidos foliares en el momento en que se formaron callos en pecíolo y posiciones basales (15 días) el segundo pico de expresión se registró en callos en los que ocurría la diferenciación de proembriones (25 días) (Mahmoud *et al.*, 2013).

La relación que existe entre los reguladores de crecimiento Picloram, 2,4-D y Dicamba con la expresión relativa de los genes *CpSERK* soporta la idea de que los genes *SERK* en *Carica papaya*, son inducibles por auxinas. Siendo en el caso de papaya, la aplicación de 2,4-D el que induce una mayor expresión relativa de *CpSERK3* y *CpSERK2* en comparación a los otros dos reguladores de crecimiento. Bhumica *et al.* (2008) demostraron que la expresión de *TaSERK1* es inducible por auxina, específicamente 2,4-D y se correlaciona con el inicio de embriogénesis somática en cultivos de hojas de trigo. De Oliveira *et al.* (2005) analizaron la expresión de *TcSERK* (Accesión AY570507.1) en explantes sometidos a la presencia de los reguladores de crecimiento 2,4-D y Thidiazuron, juntos. También Cao *et al.* (2017) reportaron un análisis transcriptómico en el que comparan la expresión de los genes involucrados en la iniciación de la embriogénesis somática de *Gossypium hirsutum* L, ellos observaron patrones de expresión entre alta y baja diferenciación para los genes *SERK1*, *SERK2* y *BAK1* (*SERK3*) en los explantes

contenidos en medio de inducción adicionado con 2,4-D, todos a 3 horas de ser iniciada la inducción.

De las diferentes concentraciones de 2,4-D utilizadas para la inducción de embriogénesis somática que se realizó en este trabajo, se analizó la expresión de *CpSERK2* y *CpSERK3*. De esto se obtuvo el mayor pico de expresión relativa para ambos genes *CpSERK2* y *CpSERK3* a las 6 horas de cultivo con la concentración de 10 mg/L de 2,4-D. Hubo un descenso en la expresión a 1 y 21 días de cultivo en ambos genes, a pesar de ello el gen *CpSERK3* es el que tuvo mayores niveles de expresión en todas las concentraciones evaluadas (2, 5 y 10 mg/L de 2,4-D). Los niveles de expresión en *C. papaya* mostraron un fold change de 7.18 para *CpSERK3* y de 2.73 para *CpSERK2*, una tendencia parecida a lo reportado por Cao *et al.* (2017) en algodón, ya que ellos encontraron expresión de *SERK2* y *BAK1* (*SERK3*) a las 3 horas de cultivo con 2,4-D (Fold change de 2.63 y 2.56, respectivamente), pero no así a los 3 días.

En *Arabidopsis thaliana in vivo*, *AtSERK1* se expresa en tejidos reproductores masculinos y femeninos, en los tejidos del embrión hasta la etapa de torpedo, también en algunos tejidos de la raíz y brote, incluyendo primordios foliares y raíces laterales en desarrollo (Hecht *et al.*, 2001; Kwaaitaal *et al.*, 2005). Se ha reportado que *AtSERK1* puede formar complejos con una proteína fosfatasa asociada a la cinasa (KAPP), la AAA-ATPasa CDC48A y una proteína 14-3-3, asociadas con la división celular y control del ciclo celular. (Shah *et al.*, 2002; Rienties *et al.*, 2005). Del mismo modo se encontró que *AtSERK1* también forma un complejo con otros dos factores de transcripción, AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) y una proteína de dedos-de-zinc perteneciente a la familia CONSTANS. Karlova *et al.* (2006) han sugerido una cadena de transducción de señales que une los receptores de membrana a factores de transcripción tales como el AGL15.

En *T. aestivum* Bhumica *et al.* (2008) evaluaron los genes *TaSERK2* y *TaSERK3* en explantes expuestos a los reguladores de crecimiento 2,4-D y Epibrasinolido a dos horas de cultivo. Ellos encontraron una mayor expresión para: *TaSERK2* en los explantes expuestos a 2,4-D y para el gen *TaSERK3* en los explantes que se expusieron a Epibrasinolido. El gen *SERK3* se ha reportado como un homólogo del gen *BAK1* en *A. thaliana* el cual es capaz de mediar la señalización de los brasinoesteroides (Nam and Li, 2002; Albrecht *et al.*, 2008). En *V. vinífera* se detectó un alto nivel expresión de *VvSERK2*

y *VvSERK3* a dos semanas de que los callos fueron transferidos a medio de inducción y a dos semanas de haberlo hecho fueron visibles los embriones somáticos. También observaron que la expresión de *VvSERK3* fue más alta en embriones que en callos (Schellenbaum *et al.* 2008). Talapatra *et al.* (2014) reportaron que *SERK* tiene un alto nivel de expresión en *M. charantia* a los 28 días de cultivo en un sistema de embriogénesis somática en el que se utilizó una combinación de BAP y NAA, sin embargo, la expresión desciende conforme aumentan los días de cultivo.

La expresión de *SERK* dependiente de auxina, también se documentó para el gen *MtSERK* (Accesión HM640008.1) de *M. truncatula*, regulado por el ANA, pero no por la citocinina BAP. Sin embargo, la adición de BAP al medio de cultivo potencia la expresión de *SERK* inducida por ANA, posiblemente mediante la estimulación endógena de síntesis de auxina (Nolan *et al.*, 2003).

En el sistema de embriogénesis somática directa de *Helianthus annuus* (Accesión: AF485386.1), los transcritos *SERK* se acumularon específicamente en la que se convirtió en la región morfogénica de los explantes, dentro de las primeras horas de cultivo. Habiendo suministrado al medio de cultivo BAP, realizaron una cuantificación de AIA endógeno y observaron que la concentración de AIA aumenta transitoriamente en los explantes durante un periodo temprano (Thomas *et al.*, 2004). También se ha sugerido un vínculo entre auxina y la expresión *SERK*, por la acumulación de transcritos de *SERK* en tejidos vegetales que contienen altos niveles de auxina, tales como el tejido vascular y primordios foliares (Hecht *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2004).

En *C. papaya* se encontró una correlación entre los reguladores de crecimiento, la expresión de los genes *CpSERK* y el número de embriones obtenidos, particularmente con 2,4-D. Al comparar los datos obtenidos de la inducción de embriogénesis somática contra los niveles de expresión, se detectó que existe un mayor número de embriones totales cuando hay una mayor expresión de los genes *CpSERK*, en especial los niveles de expresión de *CpSERK3*. Lo que sugiere que *CpSERK3* puede estar involucrado en los procesos de la iniciación de la embriogénesis somática en *C. papaya* y en el desarrollo embrionario, ya que al ser comparada su expresión contra el número de embriones en estadio cotiledonar también se encuentra una correlación positiva, contrario a lo que se encontró con los niveles de expresión para *CpSERK2* en el estadio cotiledonar.

Por lo anterior, se puede concluir que la aplicación de auxinas exógenas (particularmente 2,4-D) a embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya*, induce la expresión de los genes *CpSERK* (particularmente el gen *CpSERK3*), y que este aumento en su expresión parece estar relacionado, cuando menos parcialmente, con la inducción de embriogénesis somática y con un mayor número de embriones totales y con un mayor número de estos en la fase cotiledonar.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo de investigación en *C. papaya*, determinamos con el análisis bioinformático y filogenético, que *C. papaya* cuenta con 2 integrantes de la familia de genes *SERK* (*CpSERK2* y *CpSERK3/BAK1*), tomando en cuenta que fueron estos los que presentaban mayor porcentaje de similitud y cercanía evolutiva con los genes *SERK* reportados para *A. thaliana*. Esto se dedujo a partir de los dominios conservados característicos de esta familia de genes, mismos que se encuentra en las secuencias reportadas para *A. thaliana* y los encontrados en el genoma de papaya (Ming *et al.*, 2008). Encontramos que los genes *CpSERK* cuentan con la estructura proteica reportada para otras especies como *D. carota* (Schmidt *et al.*, 1997), *Dactylis glomerata* (Somleva *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001; Salaj *et al.*, 2008). Sin embargo, se encontraron diferencias en la región del motivo SPP específicamente en las posiciones 204 y 208 del gen *CpSERK3* en los cuales se observa el aminoácido N y para el gen *AtSERK3* en las mismas posiciones se encuentra el aminoácido T, este motivo es característico de esta familia de genes. Y en el dominio C-Terminal donde se observó un GAP desde el aminoácido 584 hasta el 640, en la secuencia correspondiente a *CpSERK3*. Motivos que, según lo reportado por diversos trabajos de investigación, varían entre especies haciéndolos específicos para cada una de ellas.

Al realizar los análisis de expresión de los genes *CpSERK* en los diferentes tejidos de la planta se pudo observar lo que a continuación se describe. La mayor expresión de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* fue en el tejido proveniente de fruto seguido del que provenía de flor, se ha reportado que el gen *SERK3/BAK1* puede estar relacionado con la reproducción de las plantas a lo que se atribuye la expresión de este gen el tejido de flor. Hamad *et al.* (2016) reportaron que en tejidos de *Malus hupehensis* el gen *MhSERK3* presentó niveles altos de expresión durante las etapas de desarrollo floral, el nivel más alto se observó durante la etapa de flor joven, seguidos por la flor madura y la etapa de frutos jóvenes.

Sin embargo, en el caso de papaya el mayor nivel de expresión de *CpSERK3* se observó en el tejido proveniente de fruto, en este trabajo se atribuye el nivel de expresión de este gen a su relación con la vía de señalización de la respuesta inmune mediada por brasinoesteroides. Es decir, que esta expresión en el fruto puede deberse al mecanismo de defensa ante patógenos de la planta. Ya que se ha reportado la expresión del *SERK3/BAK1* en frutos de tomate sometidos a la interacción con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. En dicho análisis se observó una vía de transducción de señal completa, comenzando por la recepción de señales externas (como la quitina) y continuando a través de la activación de cascadas de quinasa que involucran a los homólogos de tomate *SlySERK3* y *SlyMKK1/2* (Mitogen-activated protein kinase kinase). Analizaron las vías de la señalización del patrón molecular asociado al patógeno (PAMP) y encontraron que el gen *SlySERK3* se expresó en las diferentes etapas de la inoculación (Alkan *et al.*, 2015). También Heese *et al.* (2007) han identificado en *A. thaliana* a *SERK3/BAK1* como un componente del PAMP de las plantas. Del mismo modo se ha demostrado que el gen *SERK3* está involucrado en la señalización de *FLS2* (asociado con la recepción de flagelina) y con *EFR* (receptor del sistema inmune de la planta), con estas observaciones Chinchilla *et al.* (2007) demostraron que *SERK3* tiene un papel funcional en la señalización dependiente del receptor de reconocimiento de patrones que inicia la inmunidad innata.

Para el caso de los tejidos provenientes de hoja y tallo de *C. papaya*, en este trabajo encontramos baja expresión (Fold change 1) al analizar los genes *CpSERK*, similar a lo reportado para los niveles de expresión de *AcSERK1* en piña (*Ananas comosus* cv. Shenwan). Los cuales fueron menores en tejidos no embriogénicos (Fold change 5) y en órganos de la planta tales como tallo, hoja, cáliz, bráctea, pétalo, ovario, óvulo y antera. Sin embargo, para el tejido de raíz la expresión aumenta (Fold change 15) (Ma *et al.*, 2012), diferente a lo que encontramos en *C. papaya*, ya que en raíz se observó baja expresión de *CpSERK2* y *CpSERK3*. Singla *et al.* (2008) sugieren que las funciones de los genes de la familia *SERK* no se limitan a la embriogénesis, si no que pueden jugar diversos roles dependiendo del gen y del tejido en que se encuentre. En este sentido, se puede deducir que el nivel de expresión analizada en el fruto de papaya de este trabajo puede estar relacionada con la respuesta inmune y en el caso de la expresión en flor con la reproducción de la planta.

Durante el proceso de inducción de ES, se pudo observar una relación entre los reguladores de crecimiento y la expresión de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3*, lo que indica que estos genes son inducibles con la aplicación de auxinas exógenas como Picloram, Dicamba y más fuertemente relacionada con 2,4-D. De los datos que se obtuvieron a través de la inducción de embriogénesis somática usando embriones cigóticos inmaduros en un medio adicionado con 2,4-D, pudimos observar que el mejor tratamiento fue el de 10 mg/L, lo que concuerda con los datos reportados por Cai *et al.* (1999) y Gutiérrez-Rosati *et al.* (2006). En nuestro trabajo éste fue el tratamiento que presentó mayor número de embriones somáticos, de los cuales el mayor porcentaje se encontraba en estadio cotiledonar, siendo el estadio más desarrollado que se encontró.

Se ha documentado ampliamente que las auxinas exógenas como 2,4-D juegan un rol muy importante en la inducción de la embriogénesis somática, así como en las primeras etapas de desarrollo de los embriones somáticos. En nuestros experimentos al exponer los explantes a 2,4-D y analizar la expresión de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en diferentes tiempos de exposición, encontramos que a las 6 horas de exposición a este regulador ambos genes *CpSERK*, presentaban el mayor nivel de expresión. Siendo el gen *CpSERK3* el que presentó el mayor aumento en estos niveles. Para el caso del gen *CpSERK2* el mayor nivel de expresión se observó a 6 horas de que el explante se expusiera a 10 mg/L de 2,4-D, seguido por el explante expuesto a 2 mg/L del mismo regulador durante 1 día. Los genes *SERK* pueden estar involucrados en las primeras etapas de la embriogénesis somática de las plantas, pero su función real aún se desconoce.

Los genes *SERK1*, *SERK2* y *SERK3/BAK* también se identificaron en dos variedades de *Gossypium*. *SERK1* mostró un patrón de expresión más alta a las 3 horas de inducción, mientras *SERK2* y *SERK3* mostraron estar regulados a los 3 días de inducción, usando un medio suplementado con 2,4-D (Cao *et al.*, 2017). Del mismo modo, en el cultivo de *T. aestivum* se analizó la expresión de los genes *TaSERK1*, *TaSERK2* y *TaSERK3* y se reportó que la expresión de los tres *TaSERK* podrían regularse con 2,4-D a corto plazo bajo un tratamiento de 2 horas con 2,4-D, como lo revela el análisis de PCR en tiempo real que reportaron, además, los niveles de transcripción de *TaSERK3*, que parece ser un ortólogo de *BAK1*, mostró una mayor expresión en el tejido de base de hoja tratado con BR (Singla *et al.*, 2008).

Algunas investigaciones atribuyen el efecto de este regulador al aumento de auxina endógena cuando se usa en el medio de inducción. Uno de estos casos es el reportado por Michalczuk *et al.* (1992), ellos señalaron que, en un cultivo de zanahoria, el uso de 2,4-D en el medio de cultivo induce una respuesta embriogénica que se asocia con el aumento de los niveles endógenos de AIA. Otro ejemplo de esto se reporta en *C. canephora*, en este estudio se usó un pretratamiento de las plantas antes de la inducción de embriogénesis somática, este pretratamiento contenía ANA y Kinetina que también modificó el metabolismo endógeno de AIA (Ayil *et al.*, 2013).

En el cultivo de trigo se demostró que la inducción de embriogénesis somática está mediada por la vía de señalización de los genes *SERK*, al mismo tiempo esta vía de señalización es mediada por 2,4-D. Así mismo, la expresión de genes homólogos de *SERK* en maíz (*ZmSERK1*, *ZmSERK2*), *Medicago truncatula* (*MtSERK1*) y *Hieracium* (*HpSERK*), fue detectada durante las etapas tempranas de embriogénesis somática (Somleva *et al.*, 2000; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2003; Tucker *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004).

En nuestro trabajo de investigación, se observó que existe una correlación entre la expresión de los genes *CpSERK2* y *CpSERK3*, y el número de embriones, aunque se encontró una mayor correlación con los niveles de expresión del gen *CpSERK3*. De los análisis de embriogénesis somática y los niveles de expresión, se puede concretar que existe una estrecha relación entre las concentraciones de 2,4-D utilizadas especialmente 10 mg/L, y los altos niveles de expresión de *CpSERK3*, con el número de embriones totales y con el número de embriones maduros (cotiledonares).

En *A. thaliana* se detectó que en plántulas que se germinaron en un medio que contenía 2,4-D, *AtSERK1* se sobreexpresó. También se demostró que las estructuras embrionarias obtenidas con el tratamiento de 2,4-D, fueron formadas a un ritmo tres veces mayor respecto a la embriogénesis de *A. thaliana* sin el tratamiento de este regulador de crecimiento (Hecht *et al.*, 2001). También en *B. napus* se estudió la expresión de dos genes *SERK* (*SERK1* y *SERK2*) y se observó un aumento constante en la expresión de *BnSERK2* durante el proceso de iniciación y desarrollo de embriones a partir de microesporas. La máxima expresión se observó en la fase de maduración, es decir, en la etapa cotiledonar (Ahmadi *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que para los reguladores de crecimiento Dicamba y Picloram, también se observó la formación y desarrollo de embriones somáticos, esto se encontró en la concentración de 5 mg/L para ambos casos. Es decir, las tres auxinas exógenas mostraron una respuesta positiva en la embriogénesis somática de *Carica papaya*, sin embargo, consideramos que con 2,4-D se obtuvieron mejores resultados y por esto se decidió analizar las expresiones de los genes *CpSERK* con esta auxina.

Con estos análisis podemos decir que los genes *CpSERK2* y *CpSERK3* en *Carica papaya* son inducibles por las auxinas exógenas en las etapas tempranas de inducción, siendo 6 horas de exposición, el tiempo en que se observó el mayor nivel de expresión para ambos genes. *CpSERK3* parece estar más involucrado en el proceso de embriogénesis somática y en el desarrollo embrionario mediado por 2,4-D exógeno en papaya. Así mismo se puede deducir su probable participación en otros procesos biológicos de la planta tales como la reproducción y respuesta inmune.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

De la inducción de embriogénesis somática de *C. papaya* var. Maradol a partir de embriones cigóticos inmaduros, utilizando los reguladores de crecimiento Picloram, Dicamba y 2,4-D a concentraciones de 2, 3, 5 y 10 mg/L, se concluye que a una concentración de 2 mg/L, Dicamba y Picloram no produjeron embriones somáticos, mientras que con 2,4-D a esta concentración se obtuvo el 47% de respuesta. De acuerdo con el número de embriones somáticos obtenidos con todos los tratamientos y el análisis estadístico, se encontró que el mejor tratamiento fue el de 10 mg/L de 2,4-D seguido por el de 5 mg/L de este fitorregulador. Respecto a Dicamba y Picloram, se obtuvo mejor respuesta con la concentración de 5 mg/L para ambos casos, pero aun así se obtuvo un menor número de ES que los presentados por 2,4-D.

También se pudo observar un mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa cotiledonar con el tratamiento de 5 mg/L (70%) y 10 mg/L (85%) de 2,4-D, lo cual representa un mejor desarrollo embrionario. En el caso Dicamba y Picloram, 5 mg/L fue la concentración con mayor número de embriones en estadio cotiledonar, 61% y 48% respectivamente.

Con los análisis bioinformáticos realizados para encontrar integrantes de la familia de genes *SERK* en el genoma de *C. papaya* cv. SunUp reportado en la base de datos de NCBI, se determinó que de los 5 integrantes de esta familia de genes reportados para *A. thaliana*, el gen *AtSERK3* y *AtSERK2* presentan homología con los genes *CpSERK3* y *CpSERK2* respectivamente. *AtSERK2* y *CpSERK2* tienen un porcentaje de identidad de 94.57%, mientras que para los genes *AtSERK3* y *CpSERK3* se encontró 91.10% de similitud.

Por lo anterior, podemos concluir que *C. papaya* únicamente tiene en su genoma 2 genes tipo *SERK*; los genes *CpSERK2* y *CpSERK3*. En los alineamientos de las secuencias de genes *SERK* reportados para diferentes especies, contra los de papaya, se observaron dominios conservados entre ellas y la estructura proteica característica reportada para estos genes. Lo que corrobora que *C. papaya* únicamente tiene en su genoma dos genes de tipo *SERK*, los genes *CpSERK2* y *CpSERK3*. Lo cual podría deberse a la pérdida de genes durante la evolución y domesticación de *C. papaya*.

Con las secuencias encontradas para *CpSERK2* y *CpSERK3*, se diseñaron oligonucleótidos para analizar la expresión de estos genes durante el proceso de inducción de embriogénesis somática de *C. papaya*. Mediante un gradiente de temperatura se observó que los oligonucleótidos amplificaron a la temperatura y longitud de amplicón esperados tanto para RT-PCR como para qRT-PCR.

En la expresión basal de *CpSERK3* mediante RT-PCR, se observó una mayor intensidad de banda en los tejidos correspondientes a hoja, tallo y raíz. En el caso de *CpSERK2* hubo mayor intensidad de banda en los tejidos de embrión cigótico, tallo y raíz. *CpSERK3* y *CpSERK2* presentan alta intensidad de banda en la expresión de los tejidos embrionarios globular y torpedo, sin embargo, para el estadio cotiledonar, la intensidad de banda es ligeramente menor.

En el análisis de expresión de los genes *CpSERK* mediante qRT-PCR en los diferentes órganos de la planta de *C. papaya*, se observó una mayor expresión relativa de ambos genes en los tejidos provenientes de fruto, flor y embrión somático. El mayor nivel de expresión se presentó para *CpSERK3* en el fruto, seguido del embrión somático. En el caso de *CpSERK2*, la mayor expresión relativa se presentó en los mismos tejidos que para *CpSERK3*, pero en un nivel menor. Esto sustenta la idea de que esta familia de genes está involucrada en múltiples procesos de las plantas.

En los explantes expuestos a los reguladores de crecimiento Picloram, Dicamba y 2,4-D, se encontró que ambos genes tienen una mayor expresión relativa con 2,4-D seguido de Picloram. El mayor pico de expresión fue del gen *CpSERK3* en presencia de 2,4-D, lo que sugiere que este gen es inducible con la auxina exógena 2,4-D.

Al analizar la expresión de los genes *CpSERK* en explantes tratados con 2,4-D en concentraciones de 2, 5 y 10 mg/L, a los tiempos de exposición de 0, 6 y 24 horas, así como a 21 días, se encontró que ambos genes presentan mayor expresión a las 6 horas de exposición a la concentración de 10 mg/L. Sin embargo, el gen *CpSERK3* tuvo el máximo nivel de expresión con 10 mg/L, seguido de la concentración de 5 mg/L. Esto apoya los resultados obtenidos de la inducción de embriogénesis somática.

Con los análisis de correlación entre el número de embriones y la expresión de los genes *CpSERK*, lo que se puede concluir es que en *C. papaya* el gen que se encuentra más relacionado con la producción de embriones, así como con el desarrollo embrionario es el

gen *CpSERK3* ya que cuando se observa una mayor expresión de este gen, también se inducen un mayor número de embriones y un mayor porcentaje de estos en estadio cotiledonal, a diferencia de lo que se puede observar con el gen *CpSERK2*.

Se puede concluir que para la inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya*, el mejor regulador de crecimiento es el 2,4-D a una concentración de 10 mg/L. También que *C. papaya* cuenta con dos integrantes de la familia de genes *SERK* (*CpSERK2* y *CpSERK3*) en su genoma, que ambos genes son inducibles con 2,4-D, y que específicamente el gen *CpSERK3* está fuertemente involucrado en el proceso de embriogénesis somática (Figura 5.1).

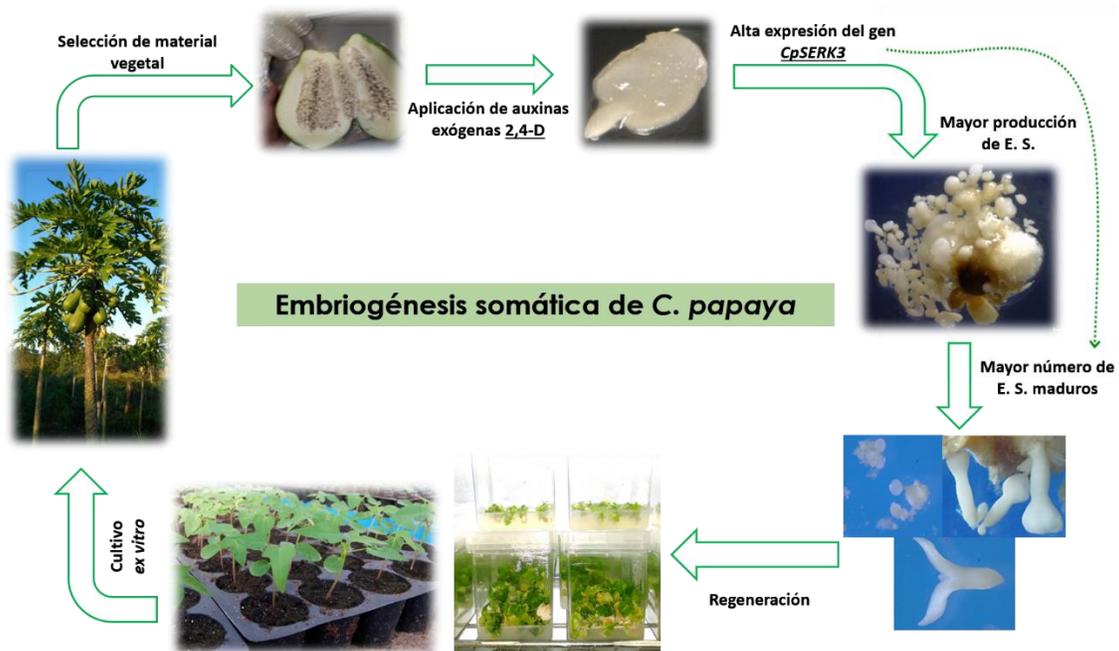


Figura 5.1. Proceso de embriogénesis somática de *C. papaya*, enfatizando el papel que juega la inducción del gen *CpSERK3* ante la exposición a 2,4-D, en la producción y desarrollo de embriones somáticos maduros en *C. papaya*.

5.3 PERSPECTIVAS

- Cuantificar la expresión de los genes *CpSERK* durante todo el proceso de embriogénesis somática incluyendo la transformación planta.
- Secuenciar los dos genes de *C. papaya* var. Maradol, *CpSERK2* y *CpSERK3* y/o haciendo RACE 5' y 3' para secuencia dominios o sitios de regulación.
- Analizar los factores de transcripción tipo *CpARF* y transportadores de auxinas tipo *CpAux/Lax* y su relación con los genes *CpSERK* durante el proceso de embriogénesis somática y tejidos de embriones somáticos.
- Cuantificar los niveles endógenos de auxinas en respuesta a la aplicación exógena de 2,4-D.
- Considerar la idea de sobre expresar el gen *CpSERK3*, con un promotor inducible por auxinas exógenas, para obtener un sistema de micropropagación o transformación genética con alta producción de embriones somáticos.
- Evaluar otros genes involucrados en la embriogénesis somática como los *CLAVATA (CLV)*, *LEC* y *WUSCHEL (WUS)* que posiblemente se encuentren presentes en el genoma de *C. papaya*.
- Evaluar el gen *CpSERK3/BAK1* con respecto a su actividad en procesos de respuesta inmune hacia insectos o enfermedades, haciendo uso de la ruta de señalización de brasinoesteroides.

BIBLIOGRAFÍA

- Aan den Toorn, M., Albrecht, C., & de Vries, S. (2015). On the origin of SERKs: bioinformatics analysis of the somatic embryogenesis receptor kinases. *Molecular Plant*, 8(5), 762-782.
- Abel, S., Nguyen, M. D., & Theologis, A. (1995). The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology*, 251:4, 533-549.
- Ahmadi, B., Masoomi-Aladizgeh, F., Shariatpanahi, M. E., Azadi, P., & Keshavarz-Alizadeh, M. (2016). Molecular characterization and expression analysis of *SERK1* and *SERK2* in *Brassica napus* L.: implication for microspore embryogenesis and plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 35:1, 185-193.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E., & de Vries, S. (2005). The *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant Cell*, 17:12, 3337-3349.
- Albrecht, C., Russinova, E., Kemmerling, B., Kwaaitaal, M., & de Vries, S. C. (2008). *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and-independent signaling pathways. *Plant Physiology*, 148:1, 611-619.
- Alkan, N., Friedlander, G., Ment, D., Prusky, D., & Fluhr, R. (2015). Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist*, 205(2), 801-815.
- Anandan, R., Soorianathasundaram, K., Kumar, N., Thirugnanakumar, S., Sudhakar, D., & Balasubramanian, P. (2008). Somatic embryogenesis in *Carica papaya* through zygotic embryo derived callus culture. In II International Symposium on Papaya, ISHS Acta Horticulturae 851. pp. 201-208.

- Arcioni, S & Mariotti D. (1982). Tissue culture and plant regeneration in the forage legumes *Onobrychis viciaefolia* Scrop., *Carolina varia* and *Lotus corniculatus* L. Plant Tissue Culture. Fujiwara. A. De Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo.
- Arora, I. K., & Singh, R. N. (1978). Growth hormones and in vitro callus formation of papaya. *Scientia Horticulturae*, 8:4, 357-361.
- Ayil-Gutiérrez, B., Galaz-Ávalos, R. M., Peña-Cabrera, E., & Loyola-Vargas, V. M. (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8:11, e26998.
- Baudino, S., Hansen, S., Brettschneider, R., Hecht, V. F., Dresselhaus, T., LoÈrz, H., ... & Rogowsky, P. M. (2001). Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta*, 213:1, 1-10.
- Bhattacharya, S S Khuspe, N N Renukdas, S K Rawal, (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explant of papaya (*Carica papaya* L. cv washington and honey dew)., *Indian Journal of Experimental Biology*. 40: 624-627.
- Bonner, J. & A.W., Galston. (1973). *Principios de la fisiología*, 5ta. Ed. Editorial Aguilar, S.A., Madrid.
- Bornhoff, BA & Harst M. (2000). Establishment of embryo suspension cultures of grapevines (*Vitis* L.). *Vitis* 39:27-29.
- Bruijne, E. D., Langhe, E. D., & Rijck, R. V. (1974). Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. In *Int Symp Fytofarm Fytiat*. 1, 637-645.
- Cabrera D., García D., Portal O. (2010). Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p): Biología, epifitología y diversidad genética como base para el manejo mediante técnicas biotecnológicas. *Biotechnology Vegetal*. 10, 67-77.

- Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-garcia, A. & Herrera-estrella (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*. 15:1–7.
- Cadenas, A. G., & Agustín, P. G. (2006). *Fitohormonas: metabolismo y modo de acción* (Vol. 8). Publicacions de la Universitat Jaume I. Castello de la Plana. España. pp. 335.
- Cai, W., Gonsalves, C., Tennant, P., Fermin, G., Souza, M., Sarindu, N., & Gonsalves, D. (1999). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 35:1, 61.
- Cao, A., Zheng, Y., Yu, Y., Wang, X., Shao, D., Sun, J., & Cui, B. (2017). Comparative transcriptome analysis of SE initial dedifferentiation in cotton of different SE capability. *Scientific Reports*, 7:1, 1-13.
- Carvalho, F. A., & Renner, S. S. (2015). IV. A Dated Phylogeny of the Papaya Family (Caricaceae) Reveals the Crop's Closest Relatives and the Family's Biogeographic History. In *Molecular Phylogeny, Biogeography and an e-Monograph of the Papaya Family (Caricaceae) as an Example of Taxonomy in the Electronic Age*. Springer Spektrum, Wiesbaden. pp. 49-81.
- Castillo, B., & Smith, M. A. L. (1997). Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Reports*, 16(6): 385-388.
- Chen, M. H., Chen, C. C., Wang, D. N., & Chen, F. C. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* and *Carica cauliflora* cultured in vitro. *Canadian Journal of Botany*, 69(9): 1913-1918.
- Chen, M. H., Wang, P. J., & Maeda, E. (1987). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Reports*, 6(5): 348-351.

- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D., & Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448:7152, 497-500.
- Choi, Y. E., Yang, D. C., & Yoon, E. S. (1999). Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 58(2): 93-97.
- Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C. E., & Schroeder, J. I. (2005). Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *The Plant Cell*, 17(12), 3350-3361.
- Das, D., Reddy, M., Upadhyaya, K., & Sopory, S. (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 20(11): 999-1005.
- De Feria, M., Jiménez, E., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., & Quiala, E. (2005). Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital. *Biotecnología Vegetal*, 5(2).
- De Oliveira, Santos, M., Romano, E., Yotoko, K. S. C., Tinoco, M. L. P., Dias, B. B. A., & Aragao, F. J. L. (2005). Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science*, 168:3, 723-729.
- De Rojas, R. V., & Kitto, S. L. (1991). Regeneration of babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(4), 747-752.
- Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., & Bakó, L. (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. En: *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Springer, Dordrecht. 267-308.

Dudits, D., Nemet, G., & Haydu, Z. (1975). Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. *Canadian Journal of Botany*, 53:10, 957-963.

Estrella-Maldonado, H., Posada-Pérez, L., Talavera, M. C., Barredo, P. F., Gómez-Kosky, R., & Santamaría, J. M. (2018). The Expression of CpAUX1/LAXs and Most of the Long-distance CpPINs Genes Increases as the Somatic Embryogenesis Process Develops in *C. papaya* cv. Red Maradol. *Journal of Plant Growth Regulation*. 37(2): 502-516.

FAOSTAT. (2018). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Disponible en: www.faostat.org.

Fiore, S., De Pasquale, F., Carimi, F., & Sajeve, M. (2002). Effect of 2, 4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1): 57-63.

Fischer, C., & Neuhaus, G. (1996). Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *The Plant Journal*, 9(5):659-669.

Fitch, M. M., & Manshardt, R. M. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports*, 9(6):320-324.

Fitch, MM, Leong T, Akashi L, Yeh A, White S, De la Cruz A, Santo, L, Ferreira S, Moore PH. (2005). Growth and yield of clonally propagated and seedling-derived papayas. I. Growth. II. Yield. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 40(5): 1283-1290.

Freire-Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4):195-209.

- Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2014). Papaya (*Carica papaya* L.): origin, domestication, and production. In Genetics and genomics of papaya. Springer, New York, NY. pp. 3-15.
- Fuentes, S. R., Calheiros, M. B., Manetti-Filho, J., & Vieira, L. G. (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60(1):5-13.
- Fuerst, E. P., Sterling, T. M., Norman, M. A., Prather, T. S., Irzyk, G. P., Wu, Y., Lownds, N. K., & Callihan, R. H. (1996). Physiological characterization of picloram resistance in yellow starthistle. Pesticide Biochemistry and Physiology, 56(2), 149-161.
- Fujimura, T., & Komamine, A. (1979). Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Physiology, 64(1):162-164.
- Gallardo, J., Posada-Pérez, L., Kosky, R.G., Más, L., Reyes, M., & Herrera, I. (2002). Micropropagación del híbrido cubano de papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 2(4): 211-215.
- Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., & Gaj, M. D. (2013). Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plos One, 8(7), e69261.
- Gray, D. J., & Conger, B. V. (1985). Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspensions of *Dactylis glomerata* (Gramineae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 4:2, 123-133.
- Griga, M. (2000). Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via somatic embryogenesis. Biologia Plantarum, 43(2): 161-165.
- Gutiérrez-Rosati, A., Jiménez, C., & Maraví, J. Y. (2006). Inducción de embriogénesis somática en Papayo (*Carica Papaya* Linnaeus). Biotempo, 6, 5-8.

Haccius, B. (1977). Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74-81.

Hamad, M., Guo, S., Zhang, L., Tomlekova, N., & Dong, W. (2016). Expression and bioinformatics analysis of *serk3* genes from triploid pingyi tiancha and tetraploid hybrid strain in malus. *Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 69(10).

Hanning, G. E., & Conger, B. V. (1982). Embryoid and plantlet formation from leaf segments of *Dactylis glomerata* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 63:2, 155-159.

He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., & Li, J. (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Current Biology*, 17:13, 1109-1115.

Hecht V., Vielle-Calzada J.P., Hartog, M.V., Schmidt, E.D.L., Boutilier, K., Grossniklaus, U., De Vries, S.C. (2001). The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127:803–816.

Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M., He, K., Li, J., & Rathjen, J. P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:29, 12217-12222.

Hu, H., Xiong, L., & Yang, Y. (2005). Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cells and host defense response against fungal infection. *Planta*, 222:107–117.

Huang, X., Lu, X. Y., Zhao, J. T., Chen, J. K., Dai, X. M., Xiao, W., & Huang, X. L. (2010). MaSERK1 gene expression associated with somatic embryogenic competence and

-
-
- disease resistance response in banana (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 28:2, 309-316.
- Hunsinger, H., & Schauz, K. (1987). The influence of dicamba on somatic embryogenesis and frequency of plant regeneration from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*, 98:2, 119-123.
- Idrovo, F. (2012). Caracterización molecular de secuencias homólogas a factores de transcripción de la familia TGA en papaya (*Carica papaya* L.). Tesis doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México. pp. 127.
- ITIS. (2017). Sistema Integrado de Información Taxonómica. *Carica papaya* L. Caricaceae Taxonomic Serial No. 22324. [on line] (Actualizado 08 noviembre 2017) Disponible en: <http://www.itis.gov/>.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Squeo, F, A., & Cardemil, L.(eds.). *Fisiología Vegetal*, 1-28.
- Karami, O., Aghavaisi, B., & Pour, A. M. (2009). Molecular aspects of somatic to embryogenic transition in plants. *Journal of Chemical Biology*, 2(4):177-190.
- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., & de Vries, S. (2006). The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *The Plant Cell*, 18:3, 626-638.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S. A., ... & Thomma, B. P. (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Current Biology*, 17:13, 1116-1122.
- Kordestani, G. K., & Karami, O. M. I. D. (2008). Picloram-induced somatic embryogenesis in leaves of strawberry (*Fragaria ananassa* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(1), 69-72.

- Kott, L. S., & Beversdorf, W. D. (1990). Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23(3):187-192.
- Kumar, H. A., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema sylvestre*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 71(1): 85-88.
- Kwaaitaal, M. A. C. J., De Vries, S. C., & Russinova, E. (2005). *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. *Protoplasma*, 226:1-2, 55-65.
- Lakshmanan, P., & Taji, A. (2000). Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*, 2(02):136-148.
- Lara-Chavez, A., Egertsdotter, U., & Flinn, B. S. (2012). Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(3):341-354.
- León, J. (1987). *Botánica de los cultivos tropicales*. Segunda edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), San José. pp. 375 – 379.
- Lewis, M. W., Leslie, M. E., Fulcher, E. H., Darnielle, L., Healy, P. N., Youn, J. Y., & Liljegren, S. J. (2010). The *SERK1* receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal*, 62:5, 817-828.
- Li L. & Qu R. (2002). In vitro somatic embryogenesis in *Turftype bermudagrass*: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breeding*. 121: 155–158.

- Litz, R. E., & Conover, R. A. (1982). In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *Plant Science Letters*, 26(2-3), 153-158.
- Litz, R. E., & Conover, R. A. (1983). High-frequency somatic embryogenesis from *Carica papaya* suspension cultures. *Annals of Botany*, 51(5): 683-686.
- Ma, J., He, Y., Wu, C., Liu, H., Hu, Z., & Sun, G. (2012). Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30:1, 195-203.
- Mahdavi-Darvari, F., Noor, N. M., & Ismanizan, I. (2015). Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(2):407-422.
- Mahmoud, K. B., Delporte, F., Muhovski, Y., Elloumi, N., Jemmali, A., & Druart, P. (2013). Expression of PiABP19, Picdc2 and PiSERK3 during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). *Molecular biology reports*, 40:2, 1569-1577.
- Malabadi, R. B., Kumar, S. V., Mulgund, G. S., & Nataraja, K. (2011). Induction of somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya*). *Research in Biotechnology*. 2:5.
- Mantelin, S., Peng, H. C., Li, B., Atamian, H. S., Takken, F. L., & Kaloshian, I. (2011). The receptor-like kinase SISERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. *The Plant Journal*, 67:3, 459-471.
- Medina, R. D., Faloci, M. M., Neffa, V. S., & Mroginski, L. A. (2003). Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 32(3):143-160.

- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., ... & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 77.
- Michalczuk, L., Cooke, T. J., & Cohen, J. D. (1992). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry*, 31:4, 1097-1103.
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., & Salzberg, S. L. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452:7190, 991-996.
- Monja-Mio, K. M., & Robert, M. L. (2016). Somatic embryogenesis in Agave: an overview. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer, Cham. pp. 283-296.
- Monmarson S., Michaux-Ferriere N., Teisson C. (1995). Cals embryogenes haute frequence issus de plantules de semis chez *Carica papaya* L.: Obtention et germination des embryons somatiques. *Fruits* 49, 279–288.
- Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Teliz, D., & Lee Campbell, C. (1993). Development of a prediction model for papaya ringspot in Veracruz, Mexico. *Plant Disease*, 77(12):1205-1211.
- Morton J. (1987). *Papaya Fruits of Warm Climates* p. 336-346. Miami FI SA.URL: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/papaya_ars.html.
- Nam, K. H., & Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 110:2, 203-212.
- Nishina, M. S., Nishijima, W. T., Zee, F., Chia, C. L., Mau, R. F. L., & Evans, D. O. (1989). Papaya ringspot virus (PRV): a serious disease of papaya. *Hawaii Institute of*

Tropical Agriculture and Human Resources University of Hawaii at Manoa.
Commodity Fact Sheet Pa-4.

Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ. (2003). Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology* 133:218–230.

Nomura, K., & Komamine, A. (1995). Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants*. Springer, Dordrecht. 20: 249-265.

Öpik, H., & Rolfe S. (2005). Plant growth hormones In: *The physiology of flowering plants* 4th edition. Willis A. J. Cambridge, New York, USA. pp. 177 – 202.

Pereira de Araújo, J. (1987). Reunión Técnica de la Red Latinoamericana de Agroindustria de Frutas Tropicales: Producción, Manejo y Exportación de Frutas Tropicales. Editorial Presencia Ltda. Bogotá, Colombia. Pp. 117-124.

Perez, R. M., Galiana, A. M., Navarro, L., & Durán-Vila, N. (1998). Embryogenesis in vitro of several Citrus species and cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(6), 419-429.

Perez-Nuñez, M.T., Souza, R., Saenz, L., Chan, J.L., Zuniga-Aguilar, J.J., & Oropeza, C. (2009). Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Report* 28:11–19.

Perrin, M, Martin D, Joly D, Demangeat G, This P., & Masson JE. (2001). Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Science*. 161: 107-116.

Posada-Pérez, L., Gómez-Kosky, R., & Reyes, M. (2007). Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. *Bioteología Vegetal*, 7(3):131–138.

-
-
- Posada-Pérez, L., Montesinos, Y. P., Guerra, D. G., Daniels, D., & Gómez-Kosky, R. (2017). Complete germination of papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol Roja) somatic embryos using temporary immersion system type RITA® and phloroglucinol in semi-solid culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(5), 505-513.
- Quiroz-Figueroa, F., Méndez-Zeel, M., Sánchez-Teyer, F., Rojas-Herrera, R., & Loyola-Vargas, V. M. (2002). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology*, 159(11): 1267-1270.
- Rashid, A. (2002). Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(1):71-77.
- Reinert, J. (1958). Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber Dtsch Bot Ges*, 71, 15.
- Renukdas, N., Mohan, M. L., Khuspe, S. S., & Rawal, S. K. (2003). Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya. *Biologia Plantarum*, 47(1):129-132.
- Rienties, I. M., Vink, J., Borst, J. W., Russinova, E., & De Vries, S. C. (2005). The Arabidopsis SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 lambda and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta*, 221:3, 394-405.
- Rimberia, F. K., Sunagawa, H., Urasaki, N., Ishimine, Y., & Adaniya, S. (2005). Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. *Scientia Horticulturae*, 103(2):199-208.
- Rodrigues-Otubo, B. M., Penteado, M. D. O., & Do Valle, C. B. (2000). Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(3):175-182.

- Rodríguez Piña Alma Laura. (2013). Determinación del efecto de compuestos secretados al medio de cultivo por explantes de *Coffea arabica* en la inducción de la embriogénesis somática. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. pp. 80
- Rose, R. J., Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Chen, S. K., Wang, X. D., Nolan, K. E., & Sheahan, M. B. (2010). Developmental biology of somatic embryogenesis. In Plant developmental biology-biotechnological perspectives. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 3-26.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., & Zipfel, C. (2011). The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, 23:6, 2440-2455.
- Roy, P. K., Roy, S. K., Hakim, L., & Mamun, A. N. K. (2016). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Papaya (*Carica papaya* L. cv. Shahi). *Nuclear Science and Applications*, 25(1&2).
- Salaj, J., Recklinghausen, I.R., Hecht, V., de Vries, S.C., Schel, J.H.N., & van Lammeren A.A.M. (2008). *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Biochemistry* 46:709–714.
- Sannasgala, K. (1989). In vitro somatic embryogenesis in *Musa*. Tesis de doctorado. Katholieke Universiteit Leuven. Leuven. Bélgica.
- Santa-Catarina, C., Hanai, L. R., Dornelas, M. C., Viana, A. M., & Floh, E. I. (2004). *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79:1, 53-61.
- Santos, M. O., Romano, E., Vieira, L. S., Baldoni, A. B., & Aragão, F. J. L. (2009). Suppression of *SERK* gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. *Plant Biology*, 11(1), 83-89.

- Savona, M., Mattioli, R., Nigro, S., Falasca, G., Della Rovere, F., Costantino, P., & Altamura, M. M. (2012). Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Experimental Botany*, 63:1, 471-488.
- Schellenbaum, P., Jacques, A., Maillot, P., Bertsch, C., Mazet, F., Farine, S., & Walter, B. (2008). Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvL1L* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 27:12, 1799.
- Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A., & De Vries, S. C. (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124:10, 2049-2062.
- SENASICA. (2017). Servicio Nacional de sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria., Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Disponible en: www.senasica.gob.mx.
- Seo, BB; Do, GS; Devi, J. Mujib, A; Myeong-je, C; Predieri, S; Banerjee, S. eds. (2004). Chromosomal and molecular analysis of somaclonal variation in certain *Allium* specie s. in: *In vitro* application in crop improvement. Enfield, EUA, Science Publishers. 79-102.
- Shah, K., Russinova, E., Gadella, T. W., Willemse, J., & de Vries, S. C. (2002). The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes & Development*, 16:13, 1707-1720.
- Sharma, S.K., Millam, S., Hein, I., & Bryan, G.J. (2008). Cloning and molecular characterization of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta*, 228:319–330.
- Shimada, T., Hirabayashi, T., Endo, T., Fujii, H., Kita, M., & Omura, M. (2005). Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene

-
-
- homologue (*CitSERK1*) from Citrus unshiu Marc. *Scientia Horticulturae*, 103:2, 233-238.
- Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T., & Kazuma, T. (2004). A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of chrysanthemum *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. *Plant Biotechnology*. 21(1): 25-33.
- Singla, B., Khurana, J. P., & Khurana, P. (2008). Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 27:5, 833-843.
- Singla, B., Khurana, J. P., & Khurana, P. (2009). Structural characterization and expression analysis of the SERK/SERL gene family in rice (*Oryza sativa*). *International Journal of Plant Genomics*.
- Somleva, M.N., Schmidt, E.D.L., & de Vries, S, C. (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (*Poaceae*) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* 19:718–726.
- Sondahl, M., Nakamura, T., & Sharp W. (1991). Propagación in vitro del café. En: Roca, W. y Mooginski Li (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali. pp. 621-642.
- Steward, F, Mapes M & Mears K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45: 705-708.
- Street, H & Withers L. (1974). The anatomy of embryogenesis in culture. *Tissue Culture and Plant Science*, pp. 179-187 Academic Press, London. New York.
- Talapatra, S., Ghoshal, N., & Raychaudhuri, S. S. (2014). Molecular characterization, modeling and expression analysis of a somatic embryogenesis receptor kinase (*SERK*) gene in *Momordica charantia* L. during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116:3, 271-283.

- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11): 847-859.
- Thomas, C., Meyer, D., Himber, C., & Steinmetz, A. (2004). Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42:1, 35-42.
- Tichtinsky, G., Vanoosthuysse, V., Cock, J. M., & Gaude, T. (2003). Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends in plant science*, 8:5, 231-237.
- Tisserat, B., Esan, E. B., & Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural reviews*, 1:1-78.
- Tucker, M. R., Araujo, A. C. G., Paech, N. A., Hecht, V., Schmidt, E. D., Rossell, J. B., & Koltunow, A. M. (2003). Sexual and apomictic reproduction in Hieracium subgenus Pilosella are closely interrelated developmental pathways. *The Plant Cell*, 15:7, 1524-1537.
- Vondráková, Z., Eliášová, K., Fischerová, L., & Vágner, M. (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Open Life Sciences*, 6(4), 587-596.
- Willemsen, V., & Scheres, B. (2004). Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis., *Annual Review of Genetics* 38:587–614.
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57:4, 443-462.
- Zhang, S., Liu, X., Lin, Y., Xie, G., Fu, F., Liu, H., & Rong, T. (2011). Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105:1, 29-37.

Zhu, YJ, Agbayani P, Moore H. (2004). Green Fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L) transformation. Plant Cell Reports. 22: 660-667.