



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ASPECTOS MOLECULARES DE LA RIZOGÉNESIS
EN PLÁNTULAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.)
CULTIVADAS *in vitro***

Tesis que presenta

HUMBERTO JOSÉ ESTRELLA MALDONADO

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
Diciembre, 2012



INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ASPECTOS MOLECULARES DE LA RIZOGÉNESIS
EN CULTIVADOS DE PAPAYA (Carica papaya L.)
CULTIVADAS in vitro

Tesis que presenta

HUBERTO JOSE ESTRELLA MALDONADO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
Diciembre, 2012





**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“ASPECTOS MOLECULARES DE LA RIZOGÉNESIS EN PLÁNTULAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) CULTIVADAS *in vitro*”**, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, dentro de la Opción Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.



Mérida, Yucatán, México; Diciembre de 2012.

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.

HUMBERTO JOSÉ ESTRELLA MALDONADO

AGRADECIMIENTOS

No tengo palabras para agradecer al Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández por el cúmulo de atenciones y paciencia que me ha brindado, gracias por hacer de mí un mejor profesionalista, de usted me llevo un gran aprendizaje en todos los aspectos, además de ser una persona admirable.

A la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz, a quien agradezco todos los atinados comentarios y sugerencias para la realización de mi proyecto, su aportación hicieron más enriquecedor este trabajo, gracias por la paciencia y gentil atención que siempre ha tenido conmigo.

Al Dr. Fabio Idrovo Espín por ayudarme siempre que lo necesite, en quien pude encontrar un compañero e invaluable amigo, gracias por brindarme parte de tu tiempo y por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida académica, tus atinados comentarios hicieron de mí un mejor profesionalista.

Muy especial cariño y admiración al M.C. Carlos Talavera May, la persona que ha estado siempre conmigo brindándome sabios consejos cuando lo necesité. Es un privilegio tenerlo como técnico y amigo. Gracias por su apoyo y amistad.

Al M.C. Francisco Espadas y Gil, gracias por el apoyo técnico que me ha ofrecido siempre para la realización de este proyecto, gracias por el aporte de ideas que enriquecieron este proyecto.

A la M.C. Anabel Solís Ruíz por la amistad espontánea que surgió entre nosotros los primeros días cuando nos conocimos, gracias por estar siempre pendiente de mis alegrías, tristezas y preocupaciones, gracias por todo amiga.

Al Ing. Fernando Contreras Marín por el apoyo técnico en la realización de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, con los que he compartido alegrías, preocupaciones y horas de desvelo, gracias a cada uno de ustedes por sus atenciones de afecto para mi persona.

Al CICY por facilitarme sus instalaciones, material y equipos para la realización de mi trabajo de tesis.

A mi comité revisor:

Dr. Yves Desjardins, Dra. Nancy Santana Buzzy, Dr. Luis Saenz Carbonell y Dr. Luis Pinzón, les agradezco a cada uno de ustedes por sus acertados comentarios, su ayuda total y por brindarme parte de su tiempo para la revisión de mi proyecto. Gracias por aceptar formar parte de este proyecto.

Al Dr. Santy Echeverria Peraza por el apoyo técnico en la realización de este proyecto.

Al personal de la unidad de Biotecnología que lo integra: académicos, administrativos, estudiantes, intendentes, gracias por hacerme sentir como en casa.

Al CONACYT por la beca de manutención otorgada No.254647

A TODOS MUCHAS GRACIAS

DEDICATORIAS

A mis padres:

Humberto Estrella Chablé y Rita María Maldonado Chán

Gracias por sus constantes consejos y apoyos que nunca me han faltado, gracias por ser mis guías en el camino de la vida y demostrarme su amor en cada paso que doy, gracias por su amor incondicional, gracias por ser mis padres.

A mis hermanos:

Aura Elena, Karla Alejandra y Carlos Humberto

Por la gran familia y unión que formamos, porque siempre me han tendido la mano cuando los he necesitado, ustedes me hacen fuerte y me impulsan a seguir adelante con sus constantes afectos de cariño que siempre han tenido con su hermanito, no saben lo afortunado que soy al tenerlos en mi vida.

A ella:

La incondicional, la que siempre ha estado conmigo en mis alegrías y tristezas, eres el motor que necesito para seguir con mis metas, te adoro con todo el alma y solo necesité un minuto para saber que te convertirías en mi adoración. *Te amo.*

Y muy especialmente a mi sobrinita Sofía Alejandra, eres un pequeño ángel que llegó del cielo, con solo una sonrisa tuya me haces sentir el tío más afortunado del mundo, quiero que sepas que te amo y que de ahora en adelante contarás conmigo para todo y en todo.

INDICE

	Pág.
INDICE DE ABREVIATURAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	xiii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3

CAPITULO I

I.1. INTRODUCCIÓN.....	5
I.2. ANTECEDENTES.....	7
I.2.1. Origen y distribución de <i>Carica papaya</i> L.....	7
I.2.2. Descripción botánica.....	7
I.2.3. Taxonomía morfológica.....	8
I.2.3.1. Características de la flor.....	8
I.2.3.2. Características de la fruta.....	8
I.2.4. Importancia de la papaya Maradol.....	9
I.2.4.1. Producción de papaya Maradol.....	10
I.2.4.2. Producción de papaya en Yucatán.....	10
I.2.5. Problemática de la papaya en condiciones <i>in vitro</i>	11
I.2.5.1. Enraizamiento y aclimatación en plántulas de papaya Maradol.....	11
I.2.6. Medio de cultivo.....	11
I.2.6.1. Medio líquido.....	12
I.2.6.2. Medio semisólido.....	12
I.2.6.3. Medio de cultivo líquido con sustratos inertes.....	13
I.2.7. Mecanismo de formación de raíces en las plantas.....	14
I.2.8. Inducción de raíces por impedancia mecánica.....	17
I.2.9. Inducción de raíces por auxinas.....	19
I.2.10. Genes involucrados en la formación de raíces adventicias.....	24
I.3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	25
I.4. REFERENCIAS.....	26

CAPITULO II

**Caracterización morfológica en diferentes sistemas *in vitro*
desarrollados para inducir la formación de raíces adventicias en
plántulas de *Carica papaya* L.**

II.1 INTRODUCCIÓN.....	37
II.2. HIPÓTESIS.....	39
II.3. OBJETIVO.....	39
II.3.1. Objetivo General.....	39
II.3.2. Objetivos Específicos.....	39
II.4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
II.4.1 Material vegetal.....	40
II.4.2. Crecimiento y regeneración de las plántulas.....	40
II.4.3. Condición experimental.....	40
II.4.4. Medición de parámetros.....	42
II.5. RESULTADOS.....	43
II.5.1. Porcentajes de germinación en vitroplantas Control.....	43
II.5.2. Establecimiento de diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i>	45
II.5.3. Tiempo en aparición de raíces.....	46
II.5.4. Número de raíces.....	47
II.5.5. Longitud de las raíces.....	52
II.6. DISCUSIÓN.....	57
II.7. CONCLUSIONES.....	61
II.8. REFERENCIAS.....	62

CAPITULO III

**Caracterización *in sílico*, estructura y filogenia de genes involucrados en el
transporte de auxinas del genoma secuenciado de papaya transgénica
(*Carica papaya* L.) var. Sun Up.**

III.1 INTRODUCCIÓN.....	67
III.2. HIPÓTESIS.....	71
III.3. OBJETIVOS.....	71
III.3.1. Objetivo general.....	71
III.3.2. Objetivos específicos.....	71

III.4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	72
III.4.1. Aislamiento <i>in silico</i> de genes tipo <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
III.4.2. Aislamiento <i>in silico</i> de genes tipo <i>CpAUX/LAX</i> y <i>CpPIN</i> de <i>Carica papaya L</i>	72
III.4.3. Agrupamiento y selección de secuencias tipo <i>CpAUX/LAX</i> y <i>CpPIN</i> de <i>Carica papaya L</i>	73
III.4.4. Predicción de ORF.....	73
III.4.5. Alineamiento de secuencias proteínicas predichas e identificación de dominios conservados de genes <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>CpAUX/LAX</i> y <i>CpPIN</i> de <i>Carica papaya</i> var. Sun Up.....	73
III.4.6. Análisis filogenéticos de las secuencias de genes <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>CpAUX/LAX</i> y <i>CpPIN</i> de <i>Carica papaya</i>	74
III.4.7. Diseño de oligonucleótidos de genes <i>CpAUX/LAX</i> y <i>CpPIN</i>	74
III.5. RESULTADOS.....	75
III.5.1. Identificación <i>in silico</i> de genes tipo <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
III.5.2. Análisis filogenético de las secuencias de genes tipo <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
III.5.3. Identificación <i>in silico</i> de genes tipo <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> en <i>Carica papaya L</i>	79
III.5.4. Alineamiento de proteínas tipo <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Carica papaya</i>	80
III.5.5. Porcentajes de identidad de las secuencias tipo <i>AUX/LAX</i> y <i>PIN</i> de <i>Carica papaya L</i>	83
III.5.6. Análisis filogenético de las secuencias de genes transportadores de entrada <i>AtAUX/LAX</i> y <i>CpAUX/LAX</i> ; y genes transportadores de salida <i>AtPIN</i> y <i>CpPIN</i>	84
III.5.7. Diseño de oligonucleótidos.....	87
III.6. DISCUSIÓN.....	88
III.7. CONCLUSIONES.....	91
III.8. REFERENCIAS.....	93

CAPÍTULO IV

Caracterización de la expresión de genes transportadores de auxinas en plántulas de *Carica papaya* L. var. Maradol expuestas a IBA bajo diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*.

IV.1. INTRODUCCIÓN.....	101
IV. 2. HIPÓTESIS.....	104
IV.3. OBJETIVOS.....	104
IV.3.1. Objetivo general.....	104
IV.3.2. Objetivos específicos.....	104
IV.4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
IV.4.1. Material Vegetal.....	105
IV.4.2. Extracción de RNA.....	105
IV.4.3. Síntesis de cDNA.....	105
IV.4.4. Análisis de RT-PCR.....	106
IV.4.5. Electroforesis de RNA.....	106
IV.5. RESULTADOS.....	107
IV.5.1. Análisis de la expresión basal en <i>Carica papaya</i> var. Maradol.....	107
IV.5.2. Análisis de la expresión de genes AUX/LAX y PIN en <i>Carica papaya</i> var. Maradol en diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i>	110
IV.6. DISCUSION.....	116
IV.7. CONCLUSIONES.....	118
IV.8. REFERENCIAS.....	119

CAPITULO V

V.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	125
V.2. CONCLUSIÓN GENERAL.....	129
V.3. PERSPECTIVAS.....	130
V.4. REFERENCIAS.....	131

INDICE DE ABREVIATURAS

AdoMet	Adenosil metionina
AIA	Ácido indol acético
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX/LAX	Genes transportadores de entrada de auxina
BioEdit	BioEdit Sequence Alignment Editor ver. 7.10.
BT	Base de tallo
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CIAT	Centro de Investigación Agrícola Tropical
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
cm	Centímetros
Cp	<i>Carica papaya</i> L.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Monómeros desoxiribonucleótidos trifosfato
EFlα	Promotor constitutive
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramos
H	Hoja
ha	Hectárea
IBA	Ácido Indol Butírico
Kg	Kilogramo
L	Litros
LQ	Sistema líquido para inducción de raíces
LQ+P	Sistema líquido + Plugs para inducción de raíces
m	Metros
MEGA 5	Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver. 5
mg	Miligramo
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Medio de cultivo Murashige and Skoog
N	Newtons
NCBI	National Center for Biotechnology Information

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIN	Genes transportadores de salida de auxina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SS	Sistema semisólido para inducción de raíces
TAE	Buffer de electroforesis Tris-acetato-EDTA
Tm	Temperatura de alineamiento
ton	Tonelada
var	Variedad
µg	Micro gramo
µL	Micro litro
µM	Micro molar
ng/µL	Nano gramo sobre micro litro
°Bx	Grados brix (sólidos totales solubles)
°C	Grados centígrados
%	Porcentaje

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
I.1. Sustrato inerte de cubos de lana de piedra volcánica. Producto Growcube de la empresa Grodan® (www.grodan.com).....	13
I.2. Organización celular y movimiento de la auxina en la punta de la raíz en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . (A) Zona meristemática de la punta de la raíz destacando el transporte mediado por "reflujo" de auxinas en la tapa lateral de la raíz a través de la epidermis hasta el meristemo basal. (B) Organización proximal-distal de la raíz. Indicada en el lado izquierdo de la raíz: meristemo apical (AM), zona de alargamiento (EZ), zona de diferenciación (DZ) y el meristemo basal (BM). (C) Sección transversal de la raíz en la zona de elongación destacando la organización circunferencial y radial de la raíz. (D) Corte transversal de una raíz inmadura que muestra la organización radial de la célula (Overvoorde <i>et al.</i> , 2010).....	15
I.3. Modelo de la interacción entre citocinina-auxina durante el desarrollo radicular en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Laplaze <i>et al.</i> , 2007).....	16
I.4. Transporte celular de las auxinas. El esquema muestra la organización de proteínas involucradas en el transporte de auxina. Proteínas PIN transportadoras de salida de distancia larga (PIN 1, 2, 3, 4 y 7), y de distancia corta (PIN, 5, 6 y 8). Las proteínas PINs transportadoras de flujo de salida se muestran en color rojo (PINs "largas"), mientras que los PINs marcados en color rosa representan PINs "cortos" (PIN5, 6 y 8). El retículo endoplasmático (ER) es marcado en gris pálido. Las flechas continuas muestran a la proteína constitutiva, y las flechas discontinuas simbolizan el proceso de transcitosis. La posible colaboración entre ABCBs y PINs se sugiere mediante la colocación de los símbolos cerca uno del otro (Zazimalová <i>et al.</i> , 2010).....	22
I.5. Modelo de acción del etileno en el crecimiento de la raíz. Se observa el involucramiento del transporte de auxina, los genes de transporte de auxina AUX y PIN (Růžicka <i>et al.</i> , 2007).....	23
I.6. Metodología general del proyecto de tesis "Aspectos moleculares de la rizogénesis en plántulas de papaya (<i>Carica papaya</i> L.) <i>in vitro</i> ".....	25

II.1.	Ilustración de los tratamientos de la condición experimental (Control y tres sistemas de inducción de enraizamiento). Plántulas en diferentes medios de cultivo (Control en medio semisólido con 7% de gar, sistema LQ (medio líquido sin agar) SS (Medio semisólido con 7% de agar) y LQ+P (medio líquido con el sustrato inerte (Plugs).....	41
II.2.	Porcentaje de germinación de plantas Control (semilla) expuestas bajo condiciones <i>in vitro</i> en medio adicionado con y sin IBA. Las barras corresponde a la desviación estándar de +/- 30 plantas.....	44
II.3.	Porcentaje de germinación en el tratamiento Control (semilla). A) Vitroplantas Control sin IBA. B) Vitroplantas Control con 2 mg L ⁻¹ de IBA. Todas las semillas fueron sembradas con la mitad del contenido de MS (Murashige y Skoog, 1962) y 7 g L ⁻¹ de agar.....	44
II.4.	Vista de la condición experimental en los tratamientos Control (semilla) y de los sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> (plántulas obtenidas vía organogénesis directa) sin auxina y con 2 mg L ⁻¹ de IBA. A) Plántulas Control sin IBA. (B) Plántulas Control con IBA. C) Plántulas en sistemas LQ, SS y LQ+P sin IBA y D) Plántulas en sistemas LQ, SS y LQ+P con IBA. * LQ (medio líquido sin agar), SS (Medio semisólido con 7% de agar) y LQ+P (medio líquido con el sustrato inerte).....	45
II.5.	Tiempo (días) en aparecer las primeras raíces en plántulas Control y en los tres diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> sin y con el contenido de IBA. La visualización de las barras con línea diagonal en los tratamientos experimentales LQ, SS y LQ+P indica que hasta el día 42 cuando terminó el experimento no hubo emisión de raíces en estos sistemas.....	47
II.6.	Tiempo (días) en aparecer raíces en los diferentes tratamientos Control y sistemas de enraizamientos <i>in vitro</i> . A) Plantas Control (Semilla) sin IBA. B) Vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> sin IBA. C) Plantas Control (Semilla) con IBA y D) Vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> con 2 mg L ⁻¹ de IBA. *(LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs).....	48
II.7.	Número de raíces en vitroplantas Control (semilla) evaluados cada 7 días sin y con la adición de 2 mg L ⁻¹ de IBA exógena.....	50

II.8.	Número de raíces producidas en plántulas Control (semilla entera) en los diferentes tratamientos <i>in vitro</i> . A) Plántulas Control sin IBA y B) Plántulas Control con 2 mg L ⁻¹ de IBA.....	50
II.9.	Número de raíces de las vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> (LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs) evaluados cada 7 días. A) Vitroplantas sin IBA y (B) Vitroplantas con 2 mg L ⁻¹ de IBA.....	51
II.10.	Número y longitud de raíces en vitroplantas en el sistema de enraizamiento <i>in vitro</i> LQ. Las vitroplantas cultivadas en este tipo de tratamiento (LQ) presentaron 3.33 raíces con una longitud promedio de 1.45 cm por plántula.....	52
II.11.	Longitud de raíces generadas en las vitroplantas Control (semilla) después de 42 días de ser cultivadas en condiciones <i>in vitro</i> sin y con 2 mg L ⁻¹ de IBA.....	54
II.12.	Longitud de raíces de las plántulas en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> (LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs) evaluadas cada 7 días. A) Vitroplantas sin IBA (-) y (B) Vitroplantas con 2 mg L ⁻¹ de IBA (+).....	55
II.13.	Longitud de las raíces en vitroplantas Control (semilla) y de los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> (LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs) evaluados al día 42 donde concluye el experimento. A) Vitroplantas Control sin IBA. (B) Vitroplantas Control con 2 mg L ⁻¹ de IBA exógena. C) Vitroplantas en sistemas LQ, SS y LQ+P sin IBA y D) Vitroplantas en sistemas LQ, SS y LQ+P con IBA.....	56
III.1.	Árbol filogenético donde se muestra las secuencias de genes transportadores de auxinas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . A) Árbol filogenético de genes tipo AtAUX/LAX (transportadores de entrada) y B) Árbol filogenético de genes tipo AtPIN (transportadores de salida).....	78
III.2.	Alineamiento de las secuencias de genes AUX/LAX de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtAUX1, AtLAX1, AtLAX2 y AtLAX3) y de secuencias homólogas del genoma de <i>Carica papaya</i> (CpAUX1, CpLAX1, CpLAX2 y CpLAX3). Los cuadros negros indican aminoácidos idénticos, los cuadros en gris indican aminoácidos similares y los de	

	blanco son aminoácidos diferentes. Las regiones de la hélice transmembranal en la estructura primaria de las proteínas AUX/LAX están marcados con cilindros azules.....	80
III.3.	Alineamiento de las secuencias de genes tipo PIN de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtPIN1</i> , <i>AtPIN2</i> , <i>AtPIN3</i> , <i>AtPIN4</i> , <i>AtPIN5</i> , <i>AtPIN6</i> , <i>AtPIN7</i> Y <i>AtPIN8</i>) y de secuencias homólogas <i>CpPIN</i> del genoma de <i>Carica papaya</i> (<i>CpPIN1</i> , <i>CpPIN2</i> , <i>CpPIN3</i> , <i>CpPIN4</i> , <i>CpPIN5</i> y <i>CpPIN6</i>). Los cuadros negros indican aminoácidos idénticos, los grises indican aminoácidos similares y los de blanco son aminoácidos diferentes. Las regiones de la hélice transmembranal en la estructura primaria PINs están marcados con cilindros azules, el dominio hidrofóbico con barra negras y el lazo hidrofílico con barra azul. Los dominios conservados TPRXS de las proteínas PINs están indicados en el recuadro rojo. En asterisco se indica los residuos de Serina característicos de los genes PINs.....	82
III.4.	Árbol filogenético donde se muestra las relaciones existentes entre las 4 secuencias de <i>Carica papaya</i> (círculos rojos) y los 4 genes tipo AUX/LAX de <i>Arabidopsis thaliana</i> (círculos azules).....	85
III.5.	Árbol filogenético donde se muestra las relaciones existentes entre las 6 secuencias homólogas <i>CpPIN</i> <i>Carica papaya</i> (círculos rojos) y los 8 genes tipo <i>AtPIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (círculos azules).....	86
IV.1.	Expresión del gen marcador utilizado como control (<i>Housekeeping</i> : 200 pb) en diferentes tejidos (R: raíz, BT: base de tallo y H: hoja) en plántulas de <i>Carica papaya</i> L. var Maradol. Provenientes de tres orígenes diferentes: Plántula <i>in vitro</i> . Plántula de semilla <i>in vitro</i> y Plántula de semilla <i>ex vitro</i> . PM indica el marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Gel al 1.5% teñido con bromuro de etidio.....	108
IV.2.	Expresión basal de genes transportadores de auxinas <i>CpAUX/LAX</i> y <i>CpPIN</i> en tres tejidos de plantas de <i>Carica papaya</i> L. var. Maradol. Expresión de los genes <i>CpAUX1</i> , <i>CpLAX2</i> y <i>CpLAX3</i> y de <i>CpPIN1</i> al <i>CpPIN5</i> . Gen marcador <i>CpEF1α</i> (<i>Housekeeping</i>). Entre paréntesis se indica el tamaño de amplicon en pb de cada gen. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.....	109
IV.3.	Análisis de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativa de genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN en vitroplantas Control y vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de	

enraizamiento <i>in vitro</i> (LQ, SS y LQ+P) en tejidos de raíz en vitroplantas de <i>Carica papaya</i> sin (-) y con 2 mg L ⁻¹ de IBA exógena (+). pb: tamaño de amplicón.....	111
IV.4. Análisis de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativos de genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN en vitroplantas Control y vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> (LQ, SS y LQ+P) en tejidos de la base del tallo (BT) de <i>Carica papaya</i> sin (-) y con 2 mg L ⁻¹ de IBA exógena (+). pb: tamaño de amplicón.....	113
IV.5. Análisis de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativos de genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN en vitroplantas Control y vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> (LQ, SS y LQ+P) en tejidos de hoja de <i>Carica papaya</i> sin (-) y con 2 mg L ⁻¹ de IBA exógena (+). pb: tamaño de amplicón.....	114

INDICE DE CUADROS

	Pág.
I.1 Jerarquía Taxonómica de <i>Carica papaya</i> L.....	7
I.2 Revisión de literatura, genes AUX/LAX y PIN, principales transportadores de auxinas involucrados en la formación de raíces en las plantas.....	24
II.1 Condición experimental para establecer los diferentes sistemas a evaluar.....	41
II.2 Porcentaje de germinación de semillas Control.....	43
II.3 Tiempo (días) en aparecer las raíces en los diferentes tratamientos (Control y Sistemas de enraizamiento) en plántulas de <i>Carica papaya</i> L.....	46
II.4 Número de raíces en las vitroplantas Control y en los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Carica papaya</i> L. var. Maradol.....	49
II.5 Longitud de las raíces de vitroplantas Control y de los diferentes sistemas de enraizamiento <i>in vitro</i> en <i>Carica papaya</i> L. var. Maradol...	53
III.1 Secuencias tipo AUX/LAX y PIN y locus en <i>Arabidopsis thaliana</i> obtenidas de la base de datos del NCBI.....	75
III.2 Genes de <i>Carica papaya</i> que presentaron homología significativamente alta con los genes AUX/LAX y PIN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
III.3 Porcentajes de identidad entre las cuatro secuencias <i>AtAUX/LAX</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y las cuatro secuencias de la familia de genes <i>CpAUX/LAX</i> de <i>Carica papaya</i>	83
III.4 Porcentajes de identidad entre las ocho secuencias tipo <i>AtPIN</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y las seis secuencias de la familia de genes <i>CpPIN</i> de <i>Carica papaya</i> L.....	84

III.5	Diseño de oligonucleótidos de las secuencias de <i>CpPIN</i> y <i>CpAUX/LAX</i> en <i>Carica papaya</i> L.....	87
IV.1	Resultados de cantidad de muestra, lecturas realizadas y rendimiento obtenidos en diferentes muestras de plantas de semilla <i>ex vitro</i> de <i>Carica papaya</i> L. var. Maradol.....	107

RESUMEN

Las plantas de algunas especies incluyendo *C. papaya* L., cuando son cultivadas *in vitro* presentan una eficiencia intermedia en su capacidad de enraizamiento. La auxina es un regulador clave para el desarrollo de las plantas y su distribución diferencial en los tejidos vegetales es establecida por un transporte polar de célula a célula que puede desencadenar una amplia gama de procesos de desarrollo incluidos la formación de raíces laterales o adventicias (rizogénesis). En este sentido, el pico en la concentración de auxina en las puntas de las raíces, es el resultado de un sistema de reflujo impulsado por transportadores de auxinas como son los de flujo de entrada (AUX/LAX) y los de flujo de salida (PIN-FORMED; PIN). Ambos sistemas regulan el mecanismo de iniciación y desarrollo de las raíces laterales. Con la finalidad de evaluar la capacidad de brotes de papaya var. Maradol de emitir raíces, se expusieron brotes a una concentración de IBA exógeno bajo 3 sistemas de enraizamiento *in vitro* que presentan diferentes grados de impedancia: sistema líquido (LQ) con 0 N de impedancia, sistema semisólido (SS) con 7.85 N y el sistema líquido adicionado con fibra de roca "plugs" (LQ+P) con una impedancia de 14.91 N. Nuestros resultados indican que en ausencia de IBA, ningún sistema fue capaz de generar raíces adventicias. En presencia de IBA, el medio (LQ) con baja impedancia, produjo casi 7 raíces por brote con longitudes de 1.45 cm en 42 días. Por otro lado, estamos reportando por primera vez, la caracterización *in silico*, la estructura y filogenia de la familia completa de genes homólogos tipo AUX/LAX integrada por 4 genes, así como la familia completa de genes tipo PIN, en *C. papaya* L., integrada por seis genes. Posteriormente, estudiamos los patrones de expresión basal de dichos genes en plántulas derivadas de semilla en *C. papaya* var. Maradol. Adicionalmente, se evaluaron los patrones de expresión de los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2* en hojas, base de tallo y raíces de plántulas de *C. papaya* L. cultivadas bajo los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* propuestos (LQ, SS y LQ+P) sin y con 2 mg L⁻¹ de IBA exógeno. En ausencia de IBA, los genes *CpPIN1* y *CpPIN2* no presentaron expresión en ninguno de los sistemas estudiados. Al ser expuestas a IBA se promovió una elevada expresión de dichos genes en hojas y base de tallos en plántulas cultivadas en los diferentes sistemas (LQ, SS y LQ+P), en el caso de *CpLAX2*, se encontró expresión aún en ausencia de IBA, pero la exposición a IBA promovió un aumento relativo en la expresión en la base de tallo

de brotes cultivados en el medio LQ y en el LQ+P, mientras que aquellos cultivados en SS no se observaron cambios en la expresión de este gen. Es interesante notar que existe un patrón de expresión diferente de estos 3 genes en hojas y base de tallo de plántulas expuestas a IBA bajo los 3 sistemas en estudio. Falta realizar más investigación para definir si el patrón de expresión de cambio en la expresión de *CpPIN1* y *CpPIN2* observado en plántulas tratadas con IBA y cultivadas en el sistema LQ, esta asociado a la mayor capacidad de rizogénica en sistemas *in vitro*.

ABSTRACT

The plants of some species including *C. papaya* L., when cultured *in vitro* exhibit an intermediate rooting capacity. Auxin is a key plant regulator for the development of plants and their differential distribution in plant tissues is established by a cell a cell polar transport that can trigger a wide range of developmental processes including the formation of lateral or adventitious roots (rhizogenesis). In this context, the peak of auxin concentration in the root tips is the result of a reflux system driven by auxin transporters. Those transporters are influx transporters (AUX/LAX) and efflux transporters (PIN-FORMED; PIN), both regulating the mechanism of initiation and development of lateral roots. In the present thesis, three different systems were tested in terms of their efficiency to promote rooting in *in vitro* cultured papaya shoots. Those systems showed different degrees of impedance in the medium: liquid system (LQ) with an impedance of 0 N, a semisolid system (SS) with 7.85 N and a liquid system with rock-fiber "plugs" (LQ+P) with a high impedance of 14.91 N. Our results indicate that without the application of exogenous IBA, no roots were formed in any of our systems. When 2 mg L⁻¹ IBA was added to the medium, those plants grown on the medium with low impedance (LQ), showed the best rooting *in vitro* of shoots, showing almost 7 roots per plant with root lengths of 1.45 cm after 42 days of culture. Additionally, we reported for the first time, the characterization *in silico*, structure and phylogeny of four homologous genes AUX/LAX type, as well as six PIN type in *C. papaya* L. Subsequently, we studied the basal expression patterns of those genes in seedlings of *C. papaya* var. Maradol. Additionally, the expression patterns of the genes *CpPIN1*, *CpPIN2* and *CpLAX2* in response to the exogenous application of 2 mg L⁻¹ IBA in *C. papaya* L. plantlets grown under the different *in vitro* systems (LQ, SS and LQ+P). Without the exogenous application of IBA, *CpPIN1* was not expressed in any of the *in vitro* systems. The exposure to IBA promoted the expression of *CpPIN1* in roots and *CpPIN2* in the stem base. *CpLAX2* on the other hand was expressed even in the absence of IBA but when exposed to IBA, a relative increase in the expression of this gene was observed in leaves and stem bases from plantlets cultivated under LQ and LQ+ P, but not under SS. More research is needed to determine whether the changes in the expression pattern observed in *CpPIN1* and *CpPIN2* in the LQ treatment, are associated with the higher rhizogenesis efficiency shown by this systems.

CAPITULO I

I.1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) pertenece a la familia Caricaceae. Esta especie crece en regiones tropicales y subtropicales de América y países africanos (Cronquist, 1981). A nivel mundial, la papaya es una fruta de alto consumo y su demanda se ha incrementado no sólo por tener buenas características sensoriales y nutritivas, sino también por el beneficio que aportan los carotenoides (Yamamoto, 1964).

En la actualidad, la propagación vegetativa de la papaya por métodos convencionales representa una dificultad al productor al no poder asegurar plantaciones hermafroditas, debido a la heterogeneidad sexual en plantas de esta especie; para superar esta limitación, la papaya se puede propagar *in vitro*.

Sin embargo, todos los estudios realizados con anterioridad para la propagación *in vitro* de *Carica papaya* L. revelan que los principales inconvenientes para propagar esta especie son el enraizamiento *ex vitro* y la aclimatación de las plantas en invernadero (Gangopadhyay *et al.*, 2009; Anandan *et al.*, 2011). La supervivencia puede alcanzar valores entre 65-85% en estas condiciones durante los primeros 7 días de cultivo *ex vitro*. Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la funcionalidad de sus raíces. Debido a los problemas ya mencionados, actualmente no existen bio-fábricas que comercialicen plantas micropropagadas de *Carica papaya* como es el caso de AGROMOD que no ha podido micropropagar esta especie. Es por ello que se deben establecer nuevas estrategias biotecnológicas para eficientizar protocolos de micropropagación en plántulas de papaya var. Maradol.

Actualmente se sabe que fitohormonas como las auxinas, están involucradas en la inducción de raíces adventicias en especies de *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* y *Oriza sativa* entre otras (Drew *et al.*, 1979; Wample y Reid, 1979). De igual manera en plantas de *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que otro factor importante que estimula la

proliferación y elongación de las raíces es la impedancia mecánica (Bengough y Kirby, 1999).

Por tal motivo, se han realizado ensayos preliminares en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), que demuestran que vitroplantas de papaya al ser sembradas en medio líquido con 2 mg L^{-1} de ácido indol butírico (IBA) y con la adición de sustratos estériles (Growcubes), inducen la producción de raíces. Se presume que la impedancia o daño mecánico que presenta las vitroplantas al estar en contacto con la superficie del sustrato, induce la producción de la raíz. Sin duda alguna, la producción de la raíz en esta etapa será de vital importancia para la supervivencia de las plántulas de papaya Maradol durante su aclimatación.

La importancia de este trabajo radicará en establecer sistemas adecuados del medio de cultivo que estimulen la síntesis de raíces para mejorar el enraizamiento de las vitroplantas vía organogénesis directa de papaya var. Maradol y así mejorar la sobrevivencia evitando su mortandad en condiciones de invernadero. El objetivo del presente trabajo será determinar y evaluar los sistemas mediante los cuales las vitroplantas de papaya var. Maradol producen raíces durante la fase de enraizamiento *in vitro*.

I.2. ANTECEDENTES

I.2.1. Origen y distribución de *Carica papaya* L.

La papaya (*Carica papaya* L.) es originaria de las planicies de la región centroamericana; la producción de papaya se ha extendido a la mayor parte de los países tropicales y subtropicales del mundo; su lugar de origen exacto se desconoce (sur de México, Centroamérica, noroeste de América del Sur). En la actualidad es cultivada en todas las regiones tropicales de América, desde México a Argentina y Brasil. En México la papaya se distribuye por el lado del Golfo de México, desde Tamaulipas hasta la Península de Yucatán, por el Pacífico se le encuentra desde Baja California a Chiapas. Se le localiza desde el nivel del mar hasta 1,500 m. Es cultivada en varios estados: Baja California, Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Yucatán, siendo Veracruz el principal productor (SAGARPA, 2010).

I.2.2. Descripción botánica

La papaya es una planta muy vigorosa y productiva, además se adapta a gran variedad de suelos y sus frutos llegan a pesar entre 1.5 y 2.6 Kg. La fruta presenta una epidermis gruesa con una coloración amarillo-naranja cuando madura y con pulpa color rojo salmón que es muy dulce y suave. En frutas hermafroditas, la pulpa y cáscara es muy firme, lo que hace a la fruta resistente al transporte, debido a su forma alargada y de tamaño mediano, facilitando el empaque (Rodríguez, 2003). En el Cuadro I.1 el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2011), clasifica a la papaya de la siguiente manera:

Cuadro I.1. Jerarquía Taxonómica de *Carica papaya* L.

Reino	Plantae
Sub-reino	Viridaeplantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Caricaceae
Género	<i>Carica</i> L.
Especie	<i>Carica papaya</i> L.

I.2.3. Taxonomía morfológica

El árbol de papaya Maradol es de porte mediano, cuya altura promedio es de 2.15 m, pudiendo llegar hasta 2.30 m en función de la agrotécnica y de la edad. El diámetro que presenta el tallo alcanza 12.5 cm a los 13 meses de edad, de igual forma puede aumentar por los mismos factores antes mencionados (Rodríguez y Jiménez, 2004).

Es una planta precoz, puede iniciar la producción entre los primeros 7 a 8 meses de edad y estabilizar la cosecha a los 12 meses de plantada en el campo. El rendimiento en el cultivo está en función de las condiciones climáticas y agrotécnicas en que se desarrolle la planta, pudiendo alcanzar más de 200 t/ha. Las hojas son lobuladas y su limbo llega a medir hasta 80 cm de ancho por 74 cm de largo y los pecíolos de 85 a 90 cm de largo (Rodríguez *et al.*, 2002). La raíz es pivotante, con varias raíces secundarias, alcanzando más de 1 metro de profundidad en dependencia del tipo de suelo y se extienden en correspondencia a la longitud de las hojas del centro del área foliar. El mayor volumen de raíces absorbentes aparece en los primeros 30 cm del suelo (Rodríguez, 2003).

I.2.3.1. Características de la flor

En las plantas de papaya existe un comportamiento muy característico para esta especie, las flores se presentan de la siguiente manera: los tipos I (Femenina), II (Elongata) y III (Masculina) la cual casi nunca aparece cuando se utiliza una semilla procedente de un buen programa de mantenimiento genético (Rodríguez *et al.*, 2002).

I.2.3.2. Características de la fruta

El fruto presenta maduración lenta, pulpa suave y gran consistencia. Piel lisa, gruesa y resistente, presentando larga vida de anaquel. La papaya Maradol produce frutos cilíndricos (alargados) y redondos, de color rojo salmón en su interior al madurar y de color naranja brillante en su exterior cuando alcanza la madurez fisiológica. El tamaño del fruto oscila entre 22 a 27 cm de largo y de 9 a 13 cm de diámetro. La cavidad mide entre 3 y 4.5 cm. El contenido de sólidos solubles es en promedio de 12°Bx, pudiendo bajar si existe carencia de potasio asimilable en el suelo (Jiménez y Rodríguez, 1998).

I.2.4. Importancia de la papaya Maradol

La papaya var. Maradol es uno de los cinco principales frutales de México y en los últimos años se ha sostenido mayor crecimiento en las zonas costeras de México, además de ser cultivada en todos los países tropicales y en muchas regiones del mundo. Aunque el área exacta de origen es desconocido, es probable que se haya originado de las tierras bajas de Centroamérica, desde México hasta Panamá (Nakasone y Paull, 1998; Campostrini y Glenn, 2007).

En México se cultivan diferentes variedades que se han nombrado en función del tamaño, forma, apariencia y procedencia de la fruta. En las plantaciones comerciales se utilizaba la semilla de tipos criollo, entre los que destacan "Cera", "Coco", "Mamey", y también se cultivaban algunos cultivares del grupo Solo originados en Hawai e incluso cultivares provenientes de Taiwán como "Tainung II" y "Red Lady" (De los Santos *et al.*, 1997).

I.2.4.1. Producción de papaya Maradol

A nivel mundial, la producción de papaya var. Maradol se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. En 2004, según datos de la FAO, existían en todo el mundo 365,846 ha sembradas con esta variedad, de las cuales se obtuvo una producción de aproximadamente 6.5 millones de toneladas, Brasil es el mayor productor mundial al aportar el 26% de la producción total, seguido de México con un 15%, Nigeria e India con un 12% y 11%, respectivamente.

El consumo de papaya ha cobrado mayor importancia en la última década, debido al interés de los consumidores por las características de este fruto, lo que ha propiciado la expansión de su producción. La superficie cultivada en el mundo en 1996 fue de 288,568 ha que arrojaron una producción de 4,536,718 ton. Para 2006, la superficie cultivada fue de 391,073 ha con 6,590,141 ton, lo que representa incrementos del 35 y 45%, respectivamente. En este mismo período, en México se tuvo un incremento del 60% en la producción de papaya al pasar de 496,849 ton a 805,672 toneladas (FAOSTAT, 2007).

I.2.4.2. Producción de papaya en Yucatán

En Yucatán, la papaya era un cultivo tradicional, en donde las áreas plantadas de papaya criolla antes de 1995 alcanzaban unos 150 ha, casi todas ellas manejadas como cultivos secundarios. Su producción tenía como objetivo los mercados locales y algunos centros turísticos, por lo que no se usaban tecnologías avanzadas. El programa de papaya Maradol en Yucatán nace a finales de 1995, considerando los antecedentes de la introducción de esta variedad en Chiapas, Oaxaca y Guerrero desde 1989 y algunos ensayos durante 1993 y 1994 en Yucatán (Gobierno del Estado de Yucatán, 1999).

De acuerdo con las estadísticas de FAOSTAT (2007), en 1996 solamente en cuatro estados de la República Mexicana se produjo papaya Maradol, siendo Yucatán el estado que ocupó el segundo lugar con 6,813 toneladas procedentes de 138 ha. Esta producción representó el 26% de la producción nacional, la cual fue de 26,099 toneladas. A nivel nacional, la variedad Maradol apenas representó el 6.6% del total de la producción de papayas en general. Para 2006, Yucatán fue el cuarto estado productor de papaya Maradol con 53,947 toneladas que representa el 7% de 764,760 toneladas que se produjeron en 20 estados de México. El 95% de las 799,589 toneladas que se produjeron correspondió a la variedad Maradol, estas cifras muestran la importancia que ha cobrado la variedad Maradol en el consumo de la población de México.

La producción de la papaya Maradol se ha extendido de cuatro estados, hace unos 12 años, a 20 estados en 2006. Aunque el estado de Yucatán pasó de ser el segundo al cuarto productor, la superficie y la producción de papaya Maradol en Yucatán crecieron aproximadamente tres veces de 2000 a 2004 y se mantuvo en 2006. La producción nacional se ha incrementado en forma similar. México ha ocupado el segundo al cuarto lugar dentro de los países productores de papaya en el mundo y se consolida como el principal país exportador de papaya hacia los Estados Unidos (SIAP, 2007).

I.2.5. Problemática de la papaya en condiciones *in vitro*

El cultivo *in vitro* crea un ambiente donde hay una alta humedad relativa, con un bajo intercambio de gases, dado por el cierre hermetico de las cajas de cultivo. Esto también provoca que la regulación estomática resulte ser un problema para aclimatar plántulas *in vitro*, la cual provoca un estrés hídrico, las condiciones de cultivo *in vitro* inducen alteraciones anatómicas y fisiológicas de las plántulas que se desarrollaron bajo estas condiciones. Por esta razón se requiere mantener una alta humedad en los primeros días después del trasplante; para este propósito laboratorios comerciales tienen sistemas de nebulización o bien el uso de anti-transpirantes (Preece y Sutter, 1991).

I.2.5.1. Enraizamiento y aclimatación en plántulas de papaya Maradol

El enraizamiento y la aclimatación son fundamentales para el establecimiento de plantas de papaya en la micropropagación. Los protocolos desarrollados para aumentar el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de papaya en aclimatación representan serias dificultades para los investigadores. El enraizamiento *ex vitro* y la aclimatación son las etapas críticas de cualquier protocolo de propagación en este cultivo. Una humedad relativa entre el 95 al 100% es necesaria durante los primeros 15 días cuando las plantas son transferidas a condiciones *ex vitro*. La supervivencia puede alcanzar valores entre 65-85% en estas condiciones durante los primeros 7 días de cultivo. Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus raíces. En la papaya resulta fundamental y merece una mayor atención mantener una alta humedad relativa (cámara húmeda) para lograr mayor éxito en la adaptación a las condiciones ambientales (Nhut *et al.*, 2003).

I.2.6. Medio de cultivo

El cultivo de tejidos vegetales se refiere a la técnica de cultivo de células, plantas, tejidos, órganos, semillas u otras partes de plantas en un ambiente estéril en un medio nutritivo. Así el medio de cultivo consiste en una mezcla de sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes. Son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores

han descrito después de numerosos experimentos y que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*. López (1990) indica que en general los medios de cultivo se encuentran constituidos por sales inorgánicas (micro y macro-nutrientes), agentes quelantes, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento (auxinas/citocininas), carbohidratos, agentes gelificantes y agua.

Se utiliza casi siempre un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) al cual se le adicionan reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones además de otros aditivos. Los agentes de solidificación se agregan a los medio ya preparados antes de la esterilización de éstos. Entre los agentes gelificantes se muestran los siguientes:

1. Bacto-agar (0.7%).
2. Bacto-agar (0.8%, purificado en tres lavados consecutivos de agua destilada).
3. Agar (0.6%).
4. Gelrite (0.12%)
5. Medio líquido, con soporte de algodón o de papel filtro.

I.2.6.1. Medio líquido

Son medios o caldos que no contienen Agar y su composición (además de agua) suele contener al menos una fuente de carbono, sales minerales, y a veces según las características del medio, reguladores de crecimiento, vitaminas, peptonas, aminoácidos, entre otros. El cultivo en medio líquido resulta imprescindible cuando la propagación *in vitro* es desarrollada a través de las siguientes vías: Inducción de embriogénesis, cultivo de protoplastos y cultivo de suspensiones celulares (López, 1990).

I.2.6.2. Medio semisólido

Son medios intermedios entre los medios líquidos y sólidos, su proporción de agar suele ser suele ser inferior al 7.5%, pero siempre suele presentar cierta cantidad que le proporcione una consistencia semisólido. En el caso de un medio sólido o semisólido, la concentración y calidad del agar pueden tener importantes efectos en el desarrollo del cultivo (hiperhidricidad, crecimiento lento, etc.) (López, 1990).

I.2.6.3. Medio de cultivo líquido con sustratos inertes

El medio líquido con sustratos inertes (por ejemplo Grodan®) gracias a sus fibras hidrofílicas, losas de sustrato, bloques y tapones deben de inducir un mejor enraizamiento, la uniformidad y la re-saturación de la cantidad de agua, así como la distribución de los nutrientes en el medio de cultivo. Estos sustratos deben ayudar en el crecimiento de la planta, que no sólo se caracteriza por la máxima homogeneidad, sino por el desarrollo radicular óptimo. Los sustratos inertes pueden estar hechos de lana de piedra volcánica natural. Los sustratos no aportan sustancias que puedan afectar el crecimiento del cultivo, ni tampoco las retiene. Otra cualidad de este tipo de sustrato de lana de piedra volcánica es el excelente equilibrio de la relación aire/agua. En este tipo de sustrato inerte, el agua está en un 90% disponible para la planta.

El sustrato inerte tipo Growcube (Figura I.1.) son pequeños cubos que retienen el agua en un 90%. La rigidez de los cubos se traduce en una unidad de sustrato con muchas cavidades, asegurando un alto y continuo porcentaje de porosidad. Las medidas es de 1 cm³. El contenido de agua de los Growcube asegura la capacidad de absorción de las raíces.



Figura I.1. Sustrato inerte de cubos de lana de piedra volcánica. Producto Growcube de la empresa Grodan® (www.grodan.com).

I.2.7. Mecanismo de formación de raíces en las plantas

Las raíces de una planta determinan la capacidad de un organismo sésil para adquirir nutrientes y agua, así como proporcionar un medio para controlar una amplia gama de condiciones ambientales. La caracterización inicial de las auxinas como "hormonas formadoras de raíces en las plantas", estableció un vínculo para el desarrollo radicular y la orquestación de la arquitectura de la raíz principal (Went, 1929; Thimann y Went, 1934).

Una sola raíz contiene un número de células, que puede ser caracterizado por marcadores visuales y moleculares (Dolan, 1998; Birnbaum *et al.*, 2005; Laplace *et al.*, 2005; Brady *et al.*, 2007). El desarrollo, organización, y el patrón de estos tipos de células es típicamente descrito usando terminología que abarca la estructura circunferencial, radial y longitudinal de una raíz individual (Figura I.2). A lo largo del eje proximal-distal una raíz es caracterizada por una serie de zonas de desarrollo (Figura I.2.) (Ishikawa y Evans, 1995). El centro quiescente (QC) promueve estas células vecinas para producir continuamente células iniciales que dan lugar a células hijas. A través del tiempo, células que surgen cerca del QC se someten a nuevas rondas de división y se desplazan desde la zona meristemática de la raíz. La región de crecimiento de la raíz donde la tasa de división celular se acrecienta, es donde empieza la expansión celular que es conocida como meristemo basal (Figura I.2) (Beemster *et al.*, 2003; De Smet y Jurgens, 2007; Nieuwland *et al.*, 2009), posteriormente, principian en la zona de elongación y después hacia la zona de diferenciación, es así como el eje longitudinal de la raíz representa un gradiente constante de renovación y diferenciación celular. Aunque muchos de los acontecimientos de desarrollo que regulan el patrón y la capacidad para formar raíces laterales no son observables, la superficie epidérmica de la raíz conlleva marcadores detectables de transición entre estas zonas distintas: una mayor duración de las células epidérmicas demarca la transición entre la zona meristemática, de elongación y la aparición de los pelos radiculares que marca el inicio de la zona de diferenciación (Overvoorder *et al.*, 2010).

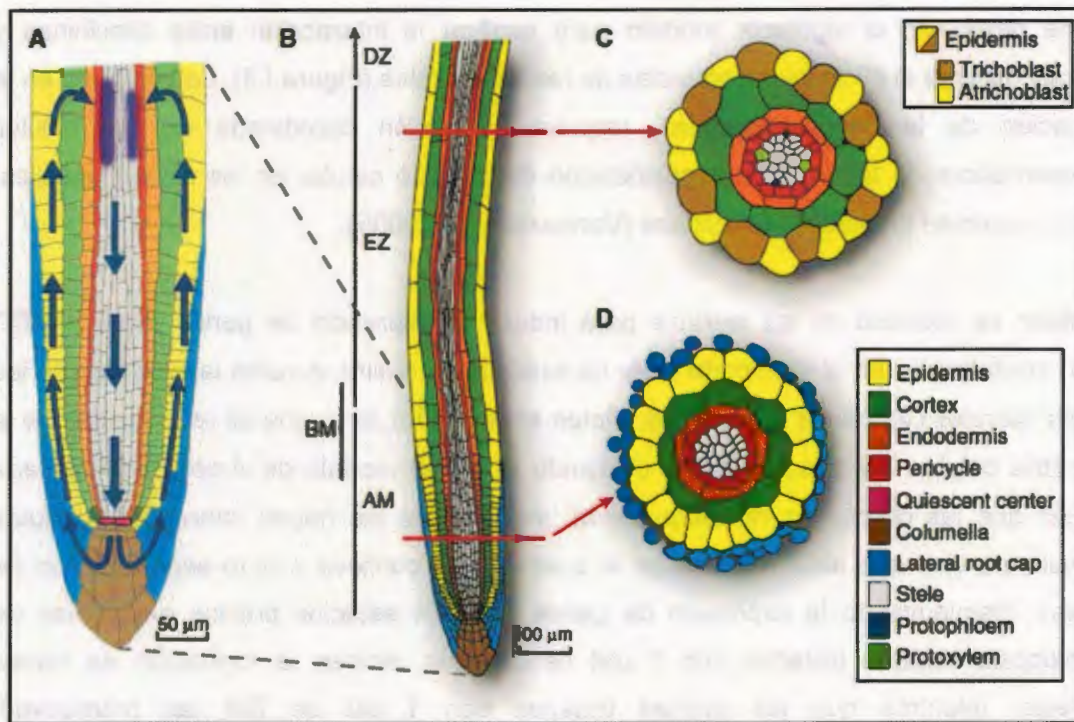


Figura 1.2. Organización celular y movimiento de la auxina en la punta de la raíz en plantas de *Arabidopsis thaliana*. (A) Zona meristemática de la punta de la raíz destacando el transporte mediado por "reflujo" de auxinas en la tapa lateral de la raíz a través de la epidermis hasta el meristemo basal. (B) Organización proximal-distal de la raíz. Indicada en el lado izquierdo de la raíz: meristemo apical (AM), zona de alargamiento (EZ), zona de diferenciación (DZ) y el meristemo basal (BM). (C) Sección transversal de la raíz en la zona de elongación destacando la organización circunferencial y radial de la raíz. (D) Corte transversal de una raíz inmadura que muestra la organización radial de la célula (Overvoorde *et al.*, 2010).

Se ha propuesto el siguiente modelo para explicar la interacción entre citocininas y auxinas durante el inicio de la formación de raíces laterales (Figura I.3). La iniciación en la formación de las raíces laterales, requiere la acción coordinada de las células meristemáticas de la raíz y la especificación del destino celular en las raíces laterales, ambos sistemas inducidos por auxinas (Vanneste *et al.*, 2005).

También se requiere de las auxinas para inducir la expresión de genes PINFORMED (PIN) involucrados en el transporte polar de salida de la auxina durante la iniciación de las raíces laterales (Vanneste *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005), la auxina es responsable de la asimetría celular. Trabajo anteriores utilizando la planta modelo de *Arabidopsis thaliana* indican que las citocininas no bloquean la iniciación de las raíces laterales en células radiculares, sino que actúan en inhibir la auxina, esto conlleva a la re-especificación de células, disminuyendo la expresión de genes PIN. En estudios previos en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con 1 μM de Cinetina inhiben la formación de raíces laterales, mientras que las plantas tratadas con 1 μM de IBA las promueven, probablemente esto es mediado por la sobreexpresión de los genes PIN (Ver Figura I.3, Laplace *et al.*, 2007).

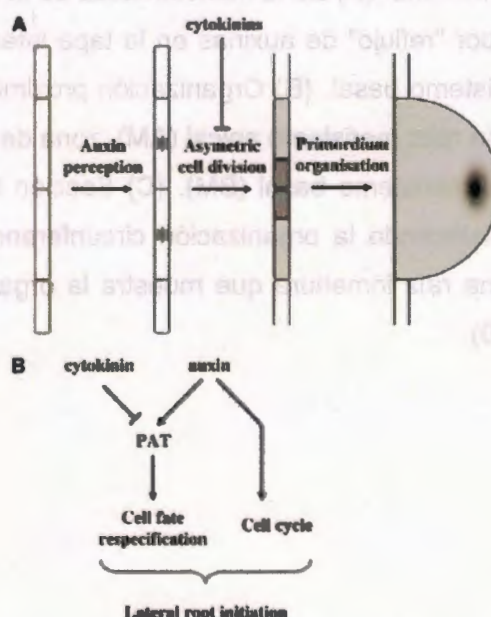


Figura I.3. Modelo de la interacción entre citocinina-auxina durante el desarrollo radicular en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Laplace *et al.*, 2007).

I.2.8. Inducción de raíces por impedancia mecánica

La respuesta de las raíces a la impedancia mecánica ha sido abordada en la literatura en gran medida desde el punto de vista físico. Las propiedades de los suelos que les hacen ser impenetrable por las raíces se han analizado en detalle, con particular referencia a la textura del suelo, es por tanto la impedancia mecánica uno de los factores más importantes que determinan la elongación de la raíz y la proliferación dentro de un perfil de suelo (Atwell, 1993). Las raíces de las plantas necesitan del suelo para obtener agua y nutrientes, es así que necesitan superar la compacidad física del suelo para crear un anclaje firme a la planta. Las raíces están dotadas de mecanismos que les permite penetrar en medios densos, sin embargo, varios son los componentes de esta respuesta fisiológica que se han identificado incluyendo cambios en el pH, especies reactivas de oxígeno (ROS), señalización inducida por Ca^{+2} , percepción de etileno y la modulación en el transporte de auxinas (Santisree *et al.*, 2012).

Las raíces parecen ser capaces de detectar el estímulo táctil y la determinación de la impedancia física ejercida por el suelo para estimular el crecimiento de la raíz (Monshausen *et al.*, 2008). Las raíces al encontrar un obstáculo tal como una capa dura de suelo, reorientan su crecimiento en zonas menos duras o bien desarrollan la fuerza mecánica suficiente para penetrar (Simmons *et al.*, 1995). Las plantas al ser inmóviles, dependen del apoyo mecánico que proporciona el sistema de raíces. Las raíces laterales, formadas por la iniciación y el desarrollo post-embrionario, crecen en respuesta a señales ambientales específicas. De esta manera, una planta puede optimizar la absorción de nutrientes y agua, por lo tanto, la arquitectura de la raíz es un rasgo agronómico importante que determina la iniciación de las raíces laterales (De Smet *et al.*, 2006).

En un estudio pionero reportado por Okada y Shimura, (1990): Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching; examinaron el crecimiento de las raíces en plantas mutantes de *Arabidopsis* cuando eran expuestas en medio solidificado con altas concentraciones de agar (1,5%) en placas inclinadas en un ángulo de 45 °. Mientras que las raíces de tipo salvaje mostraron un patrón de crecimiento ondulado debido a una respuesta de evitación debida al obstáculo, las raíces de las plantas mutantes carecían del crecimiento ondulado o mostraron un patrón anormal. En muchos

casos, la identificación de los genes de estos mutantes (*PIN1*, *PIN2* Y *AUX1*) mostraron defectos en el transporte de auxina, lo que subraya el papel del transporte de auxinas y señalización en la superación de la impedancia mecánica durante el crecimiento de las raíces.

Según lo reportado por Ditengou *et al.*, (2008) en su estudio: Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*; la iniciación de las raíces laterales en plantas de *Arabidopsis thaliana* puede ser inducida mecánicamente por cualquier curvatura gravitrópica o por la flexión transitoria de la raíz. También reportan que las auxinas se acumulan en el sitio de la inducción de las raíces laterales antes de que el primordio comience a formarse. Ditengou *et al.*, (2008) describen que existe una relocalización subcelular de *PIN1*, una proteína de transporte de auxina, en el protoxilema solo en respuesta a la curvatura gravitrópica. Es así como se demuestra que el transporte de las auxinas regulan la señalización nuclear y son necesarias para la formación de las raíces laterales.

Bajo condiciones controladas, la tasa de crecimiento de las raíces varía en proporción inversa a la impedancia mecánica. En trabajos previos realizados por Goss y Russell (1980) titulado "Effects of Mechanical Impedance on Root Growth in Barley, *Hordeum vulgare* L.", encontraron que la iniciación de la raíz lateral y el crecimiento de los pelos radicales se produjo donde existió un tipo de impedancia u obstáculo mecánico, las raíces predominaron en el lado convexo mientras que los pelos radicales dominaban en el lado cóncavo.

La respuesta de las raíces a la impedancia mecánica difiere entre especies, variedades dentro de una especie, y etapas de desarrollo. Sin embargo, existen pocas comparaciones directas de la sensibilidad de las raíces a cambios físicos del suelo (Powell, 1989; Materechera *et al.*, 1991). Gran parte de la investigación sobre el efecto de la impedancia mecánica sobre el crecimiento radicular se ha preocupado por el comportamiento de las raíces cultivadas en sistemas artificiales, como la hidroponía donde los factores se mantienen constantes (Gill y Miller, 1956; Barley, 1962, 1963; Abdalla, 1969; Goss, 1974; Bengough y Mullins, 1990).

I.2.9. Inducción de raíces por auxinas

La formación de las raíces es un pre-requisito a largo plazo para la supervivencia de las plantas. La inducción de raíces adventicias se ha atribuido a varias hormonas vegetales (Drew *et al.*, 1979; Wample y Reid, 1979). Las auxinas se han reportado de importancia para el enraizamiento en plantas de *Rumex palustris* y *Rumex thyrsiflorus* usando diferentes concentraciones de ácido indol butírico (IBA), con esta fitohormona se indujeron la formación de raíces adventicias *in vitro* (Visser *et al.*, 1995).

La formación de raíces laterales puede ser inducida por el aumento en el contenido de auxina (Jönsson *et al.*, 2005), y, más concretamente, por la activación local de la síntesis de auxina en las células del periciclo (Sick *et al.*, 2006). En principio, hay dos procesos que tienen el potencial de modificar el nivel de cualquier compuesto en una célula: metabolismo y transporte. En efecto, en el caso de la auxina, ambos cambios metabólicos de la auxina, así como su transporte se han demostrado estar involucrados en la modulación de desarrollo, en particular en raíces de las plantas (Petrásek y Friml, 2009; Vanneste y Friml, 2009). Múltiples proteínas de transporte están obligadas a mantener los flujos direccionales de auxina dentro de los órganos y tejidos (Zazímalová *et al.*, 2010).

La distribución de auxina nativa (típicamente ácido indol-3-acético) en el cuerpo de la planta se realiza a través de ambas distancias cortas y largas (por ejemplo, entre las células adyacentes, así como entre el ápice del brote y los sitios de iniciación de raíces laterales, respectivamente) (Zazímalová *et al.*, 2010), sin embargo, la clave para entender cómo la auxina puede moverse a través de la membrana plasmática (PM) se encuentra en su naturaleza físico-química. Debido a que todas las auxinas son ácidos débiles, su forma molecular (protones disociados o no disociados), y por lo tanto su capacidad de penetrar a través de la membrana, depende del pH. En las plantas, el pH apoplástico es aproximadamente 5,5 como resultado de protones extruidos por la PM H^+ -ATPasa (Figura I.4). A este pH, el equilibrio de las moléculas de IAA ($pK_a = 4,85$) se calcula que es aproximadamente 83% disociado (aniónico, A^-) y 17% de los protones esta asociado (HA, es decir, no disociado). Aunque la naturaleza hidrófoba del grupo indol en IAA permite la asociación de la molécula con la superficie de la PM, la carga negativa de un grupo carboxilo disociado en la molécula evitará que atraviese la membrana. Como tal, sólo el

protón-asociado (es decir, no disociada) de IAA moléculas pueden entrar en la célula por difusión lipófilico (movimiento pasivo) a través de la membrana plasmática sin la ayuda de una proteína portadora (Zazimalová *et al.*, 2010).

En el citoplasma de las células de la planta, el pH es de aproximadamente 7; a este pH, el equilibrio de las moléculas de auxina se desplaza casi por completo a la forma aniónica, disociada. Una extensión obvia lógica de esta observación es que la localización asimétrica de los transportadores puede proporcionar el flujo direccional celular de la auxina y que asimetrías acoplados a las células adyacentes puede establecer los flujos polares. Este concepto es la base del modelo de la difusión quimiosmótica polar o hipótesis quimiosmótica (Rubery y Sheldrake, 1974; Goldsmith, 1977).

El anterior fundamento físico-químico implica la necesidad de transportadores activos de moléculas de auxinas fuera de las células, en este sentido existen dos familias que actúan como complejos patrones de flujo de auxina localizado a través del reflujo de las vías. El importador de auxina **AUX/LAX** y el transportador de flujo de salida de auxina **PIN**, son conocidos por ser regulados por las auxinas. La sobre-expresión de AUX/LAX mejora la cantidad de auxina que se precisan en las raíces laterales, mientras que la baja-regulación de PIN modula la separación de las raíces a lo largo del eje de la raíz principal (Grieneisen *et al.*, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas de auxina puede entrar en las células pasivamente, sin embargo, también pueden ser transportadas dentro de las células a través de la actividad de H^+ de la familia AUX1/LAX de la PM permease (Kerr y Bennett, 2007) (Figura I.4). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica un AUX1 y tres homólogos a proteínas AUX1 (LAX1, LAX2, y LAX3) (Parry *et al.*, 2001). AUX1 y las tres proteínas LAX comparten una similitud de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 80% (Parry *et al.*, 2001). La necesidad de esta captación activa de auxina en los procesos de la célula origina la afluencia alta y rápida de la auxina, como en la tapa lateral de la raíz donde AUX1 juega un papel importante en la redirección de las corrientes polares de auxina (Kramer y Bennett, 2006). Aunque es posible que algunos de los transportadores descritos anteriormente pueden ser multifuncionales, el número de

transportadores implicados en el proceso es inicialmente sorprendente (Zazimalová *et al.*, 2010).

Los miembros de la familia PIN (PIN-FORMED) están asociados con el transporte de auxina polar de auxina (Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998). De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, las proteínas PINs presentan una tipología trans-membranal similar a algunas proteínas transportadoras. En *Arabidopsis*, la familia PIN se compone de ocho miembros y se divide en dos subclados básicos, que difieren en la longitud de un bucle hidrófilo en el medio de su cadena polipéptidica. Los PINs "de distancia larga" tienen su bucle central hidrófilo ya sea parcial o significativamente alargado (PIN1, 2, 3, 4 y 7) (Tanaka *et al.*, 2006; Vieten *et al.*, 2007; Zazimalová *et al.*, 2007) indicando genes que en su mayoría muestran localización polar en la PM la cual determina la dirección del flujo de auxina (Petrásek *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006; Yang y Murphy, 2009).

En contraste con los transportadores de distancia larga, hay tres miembros de la familia PIN de distancia corta que tienen su bucle central hidrófilo ya sea parcial o significativamente reducido (PIN5, 6 y 8). Recientemente, Mravec *et al.*, (2009) demostraron que estos PINs "de distancia corta" se localizan en el retículo endoplasmático (ER). Dado que PIN5 es un transportador de auxina funcional, su localización en el ER sugiere un papel en la distribución de auxinas intracelulares y la regulación de la homeostasis celular de la auxina, controlando así la disponibilidad de la auxina activa para diversas acciones celulares y sub-celulares. Ninguna de las secuencias de los PINs de distancia corta contienen un dominio de unión al ATP y por esta razón son considerados como transportadores secundarios.

El meristemo de raíz es el responsable de la arquitectura de la parte subterránea de la planta. Una combinación de técnicas experimentales y la simulación de modelos sugieren que el pico de concentración de auxina en la punta de la raíz es el resultado de un sistema de reflujo impulsado por el transporte de la auxina influenciado por varios miembros transportadores de la familia de proteínas PINs. Al igual que con los brotes, la raíz debe también periódicamente crear órganos laterales para ampliar su estructura, y los datos experimentales sugieren que este proceso también es desencadenado por niveles elevados de auxina (Dubrovsky *et al.*, 2008). En la raíz, sin embargo, el desarrollo de las

raíces laterales no parece ir acompañada por cambios en la reubicación de PIN. En un artículo de Laskowski *et al.*, (2008) sugieren que los importadores de auxinas, que son las AUX/LAX, combinado con la geometría de las propias células, es el mecanismo crucial en los patrones de iniciación de las raíces laterales.

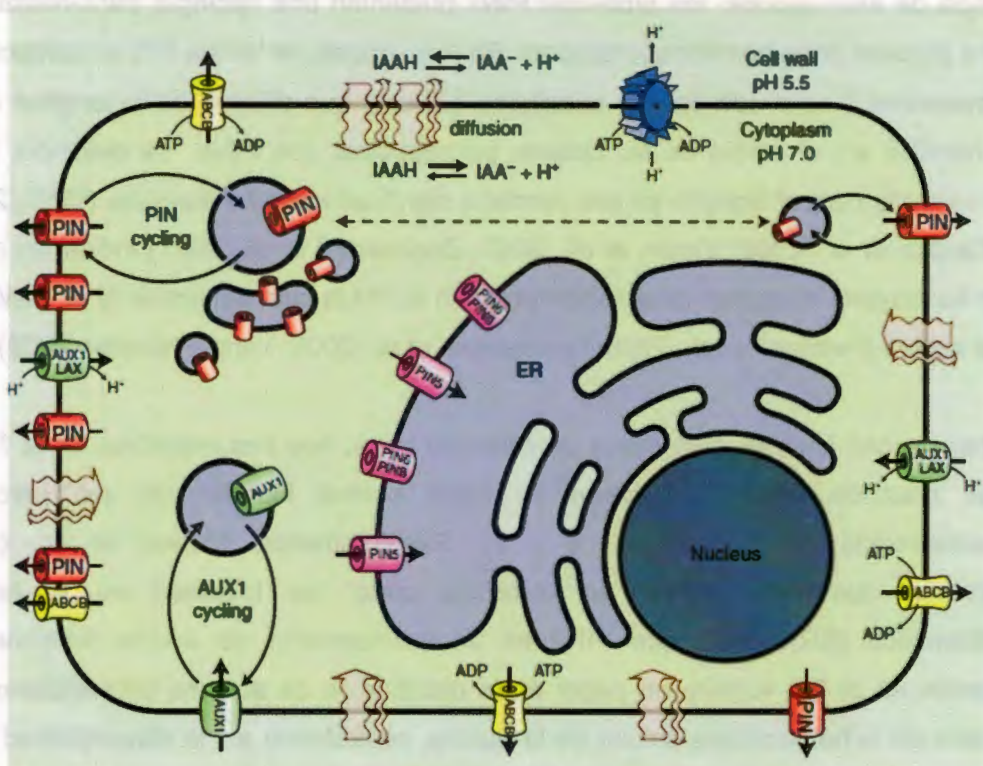


Figura I.4. Transporte celular de las auxinas. El esquema muestra la organización de proteínas involucradas en el transporte de auxina. Proteínas PIN transportadoras de salida de distancia larga (PIN 1, 2, 3, 4 y 7), y de distancia corta (PIN, 5, 6 y 8). Las proteínas PINs transportadoras de flujo de salida se muestran en color rojo (PINs "largas"), mientras que los PINs marcados en color rosa representan PINs "cortos" (PIN5, 6 y 8). El retículo endoplasmático (ER) es marcado en gris pálido. Las flechas continuas muestran a la proteína constitutiva, y las flechas discontinuas simbolizan el proceso de transcitosis. La posible colaboración entre ABCBs y PINs se sugiere mediante la colocación de los símbolos cerca uno del otro (Zazimalová *et al.*, 2010).

Růžicka *et al.*, (2007) reportaron que la auxina se redistribuye hacia la punta de la raíz y, desde allí, se trasloca a través de capas exteriores de células del meristemo de raíz en la zona de elongación. Los componentes principales del transporte de auxina en estos tejidos, de igual manera, indica que AUX1 y PIN2, están involucrados en el transporte de auxinas en las zonas de elongación, donde se acumula auxina e induce la auxina local promoviendo la elongación celular y el crecimiento de raíces en general (Figura I.5).

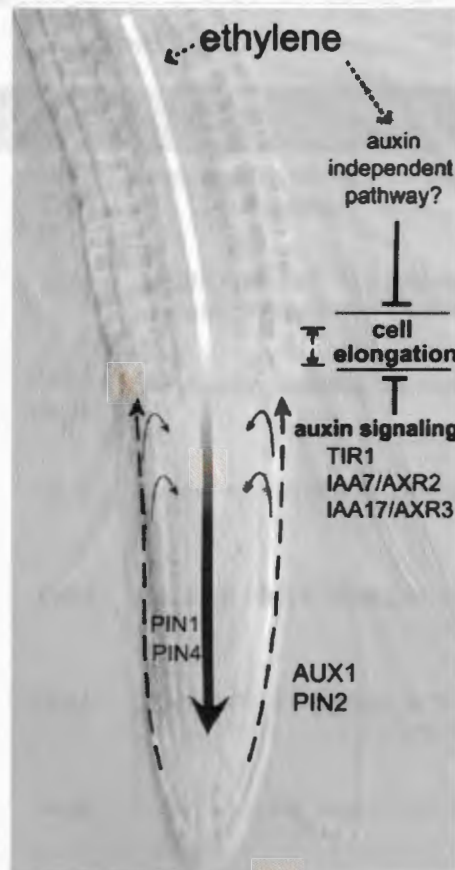


Figura I.5. Modelo de acción del etileno en el crecimiento de la raíz. Se observa el involucramiento del transporte de auxina, los genes de transporte de auxina AUX y PIN (Růžicka *et al.*, 2007).

I.2.10. Genes involucrados en la formación de raíces adventicias

Los genes involucrados en la formación de raíces adventicias (AUX/LAX y PIN) se expresan en respuesta a diferentes reguladores de crecimiento, en el siguiente Cuadro I.2 se describe cuáles son los genes involucrados en la formación de raíces:

Cuadro I.2. Revisión de literatura, genes AUX/LAX y PIN, principales transportadores de auxinas involucrados en la formación de raíces en las plantas.

Artículos	Gen	Autor	Año
Ethylene up-regulates auxin biosynthesis in <i>Arabidopsis</i> seedlings to enhance inhibition of root cell elongation.	PIN1-PIN2	Swarup <i>et al.</i>	2007
Intracellular trafficking and proteolysis of the <i>Arabidopsis</i> auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism.	PIN2	Abas, <i>et al.</i>	2006
The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in <i>Arabidopsis</i> roots.	PIN1 AUX1	Blilou <i>et al.</i>	2005
Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant formation root.	AUX1	Benkova <i>et al.</i>	2003
Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in <i>Arabidopsis</i> .	PIN3	Frim <i>et al.</i>	2001
AUX1 regulates root gravitropism in <i>Arabidopsis</i> by facilitating auxin uptake within root apical tissues.	AUX1	Marchant <i>et al.</i>	2001
Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of <i>Arabidopsis</i> roots.	AUX1	Rahman, <i>et al.</i>	2000
Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the <i>Arabidopsis</i> root apex.	AUX1	Swarup <i>et al.</i>	2001
Auxin and ethylene promote root hair elongation in <i>Arabidopsis</i> .	PIN1-PIN4	Pitts <i>et al.</i>	1998
<i>Arabidopsis</i> AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism.	AUX1	Bennett <i>et al.</i>	1996

I.3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

El trabajo de tesis experimental se divide en tres capítulos. Inicialmente se recolectaron muestras de plantas de papaya var. Maradol y se introdujeron *in vitro* para generar el material de análisis (Capítulo II). Posteriormente se realizó el análisis bioinformático para poder seleccionar los genes de interés (Capítulo III). Del análisis bioinformático y con los genes seleccionados se procedió a evaluarlos a nivel de expresión y evaluar su comportamiento en la formación de raíces en plantas de papaya *in vitro* de acuerdo a los tratamientos de inducción de raíces (Capítulo IV) (Figura I.6).

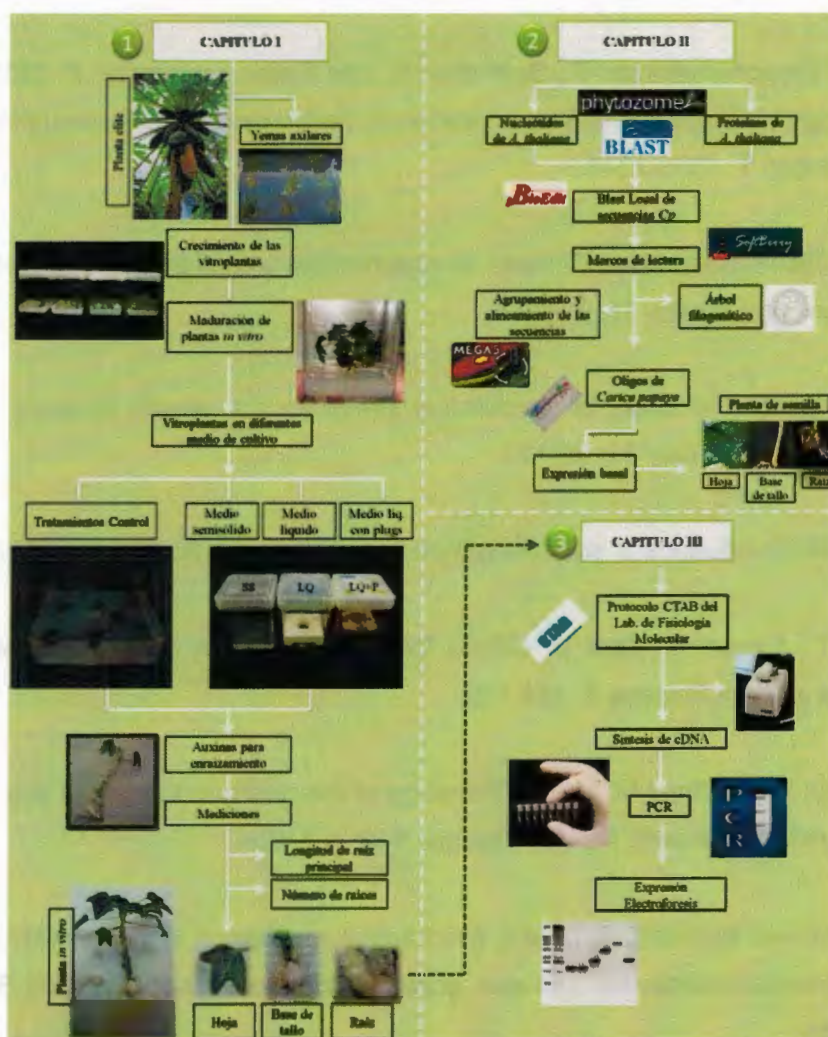


Figura I.6. Metodología general del proyecto de tesis "Aspectos moleculares de la rizogénesis en plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*".

I.4. REFERENCIAS

- Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Wiśniewska J., Moulinier-Anzola J.C., Sieberer T., Friml J., Luschig C. (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology* **8**: 249-256.
- Abdalla A.M., Hettiaratchi D.R.P., Reece A.R. (1969) The mechanics of root growth in granular media. *Journal of Agricultural Engineering Research* **14**: 326-248.
- Anandan R., Thirugnanakumar S., Sudhakar D. and Balasubramanian P. (2011) *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of *Carica papaya* L. *Journal of Agricultural Technology* **7**: 1339-1348.
- Atwell B.J. (1993) Response of roots to mechanical impedance. *Environmental and Experimental Botany* **33**: 27-40.
- Barley K.P. (1962) The effect of mechanical stress on the growth of roots. *Journal of Experimental Botany* **13**: 95-110.
- Barley K.P. (1963) Influence of soil strength on growth of roots. *Soil Science* **96**: 175-180.
- Beemster G.T., Fiorani F., Inze D. (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in Plant Science* **8**: 154-158.
- Bengough A.G. and Kirby J.M. (1999) Tribology of the root cap in maize (*Zea mays*) and peas (*Pisum sativum*). *New Phytologist* **142**: 421-425.
- Bengough A.G. and Mullins C.E. (1990). Mechanical impedance to root growth: a review of experimental techniques and root growth responses. *Journal of Soil Science* **41**: 541-358.

- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003) Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591-602.
- Bennett M.J., Marchant A., Haydn G.G., May S.T., Ward S.P., Millner P. A., Walker A.R., Schulz B., Felmann K.A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. *Science* **273**: 948-950.
- Birnbaum K., Jung J.W., Wang J.Y., Lambert G.M., Hirst J.A., Galbraith D.W., Benfey P.N. (2005) Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nature Methods* **2**: 615-619.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Mitsuhiro A. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**:39-44.
- Brady S.M., Orlando D.A., Lee J.Y., Wang J.Y., Koch J., Dinneny J.R., Mace D., Ohler U., Benfey P.N. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**: 801-806.
- Campostrini E. and Glenn D. (2007) Ecophysiology of papaya: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**: 413-424.
- Cronquist A. (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Editions Columbia Universal Press, New York. pp. 1:1262.
- De los Santos F., Becerra L.E.N., Mosqueda V.R., Vásquez H.A., Vargas G.A.B. (1997) Manual de producción de papaya en el estado de Veracruz. Folleto técnico. SAGARPA, INIFAP. Campo experimental Cotaxtla. México **17**: 23-34.
- De Smet I. and Jurgens G. (2007) Patterning the axis in plants: auxin in control. *Current Opinion Genetic Development* **17**: 337-343

De Smet I., Vanneste S., Inze D., Beeckman T. (2006) LRI or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* **60**: 871–87.

Ditengou F.A., Teale W.D., Kochersperger P., Flittner K.A., Kneuper I., Van der Graaff E., Nziengui H., Pinosa F., Li X., Nitschke R. (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 18818-18823.

Dolan L. (1998) Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity. *Genes and Development* **12**: 2091-2095.

Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil, Ivanchenko S., Friml, M.G. (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8790-8794.

FAO (2004) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Origen y distribución de *Carica papaya* L. Disponible en: www.fao.org

FAOSTAT (2007) Estadísticas de la papaya Maradol. Disponible en: <http://faostat.fao.org>

Friml J., Winiewska J., Benková E., Mendgen K. and Palme K. (2001) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809.

Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230.

Gangopadhyay G., Subhash K.R. and Mukherjee K.K. (2009) Plant response to alternative matrices for *in vitro* root induction. *African Journal of Biotechnology* **8**: 2923-2928.

Gill W.R. and Miller R.D. (1956) A method for study of the influence of mechanical impedance and aeration on the growth of seedling roots. *Soil Science Society of America Proceedings* **20**: 154-157.

- Gobierno del Estado de Yucatán. (1999) Seminario de papaya Maradol. Mérida, Yucatán, pp. 1-5.
- Goldsmith M.H.M. (1977) The polar transport of auxin. *Annual Review Plant Physiology* **28**: 439-478.
- Goss M.J. (1974) Effects of mechanical impedance on root growth. Ph.D. thesis. University of Reading.
- Goss M.J. and Russell R.S. (1980) Effects of mechanical impedance on root growth in barley (*Hordeum vulgare* L) Observation on mechanism of response. *Journal of Experimental Botany* **31**: 577-588.
- Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F.M., Hogeweg P., Scheres B. (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008-1013.
- Grodan® (2011) Products for propagation. Disponible en www.grodan.com
- ITIS (2011) Sistema Integrado de Información Taxonómica. *Carica papaya* L. Caricaceae Taxonomic Serial No. 22322. Disponible en: <http://www.itis.gov/index.html>. Actualización, Jueves, 14-Junio-2012.
- Ishikawa H., Evans M.L. (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiology* **109**: 725-727.
- Ivanchenko M.G., Napsucialy-Mendivil S., Dubrovsky J.G. (2010) Auxin-induced inhibition of lateral root initiation contributes to root system shaping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **64**: 740-52.
- Jiménez C.F. and Rodríguez N.A. (1998) Como cultivar la papaya "Maradol" en la Mixteca Poblana. ITA pp. 32-25.

- Jönsson H., Heisler M., Reddy G.V., Agrawal V, Gor V. (2005) Modeling the organization of the WUSCHEL expression domain in the shoot apical meristem. *Bioinformatics* **21**: 232-240.
- Kerr I.D. and Bennett M.J. (2007) New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochemical Journal* **401**: 613–622.
- Kramer E.M. and Bennett M.J. (2006) Auxin transport: A field in flux. *Trends Plant Science* **11**: 382-386.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M.B. (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**:3889-3900.
- Laplaze L., Parizot B., Baker A., Ricaud L., Martiniere A., Auguy F., Franche C., Nussaume L., Bogusz D., Haseloff J. (2005) GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2433–2442.
- Laskowski M., Grieneisen V.A., Hofhuis T., Hove C.A., Hogeweg P. (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology* **6**: 307-310.
- López P.C. (1990) Medios de cultivo. En: Fundamentos Teórico – Prácticos del Cultivo de Tejidos de Vegetales. En: Rosell C.H. and Villalobos, V. M. (Eds.) FAO. Roma. pp. 33-36.
- Materechera S.A., Dexter A.R., Alston A.M. (1991) Penetration of very strong soils by seedling roots of different species, *Plant and Soil* **135**: 31-41.
- Marchant A., Kargul J., May S.T., Muller P., Delbarre A., Perrot-Rechenmann C. and Bennett M.J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *The EMBO Journal* **18**: 2066–2073.

- Monshausen G.B., Swanson S.J., Gilroy S. (2008) Touch Sensing and Thigmotropism. *In*: Gilroy S, Masson P.H. eds. Plant Tropisms. Hoboken, N.J.: Blackwell Publishing. pp. 91-122.
- Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* **15**: 73-479.
- Muday G.K. and Rahman A. (2007) Auxin transport and the integration of gravitropic growth. *In* Plant Tropisms (Gilroy S. and Masson P., Eds). Oxford: Blackwell Publishing. pp. 47-78.
- Nakasone H. and Paull R.E. (1998) Tropical fruits. *Crop Production Science in Horticulture*. CAB International, Wallingford. New York. pp. 611.
- Nhut D.T., Da Silva J.A. and Aswath C.R. (2003) The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* **39**: 266-276.
- Nieuwland J., Maughan S., Dewitte W., Scofield S., Sanz L., Murray J.A. (2009) The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in *Arabidopsis* by affecting the basal meristem region. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22528-22533.
- Okada K. and Shimura Y. (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* **250**: 274-276
- Overvoorde P., Hidehiro Fukaki, and Tom Beeckman (2010) Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a001537
- Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C., Bennett M.J. (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant Journal* **25**: 399-406.

- Petrásěk J. and Friml J. (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675-2688.
- Petrásěk J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M., Seifertová D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanová M. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**: 914–918.
- Powell B.A. (1989) Aspects of root growth in compacted soil. Ph.D. thesis, University of Reading. Okada K. and Shimura Y. (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* **250**: 274-6.
- Preece J.E. and Sutter E.G. (1991) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In*: Micropropagation Technology and application. Debergh D.C. and Zimmerman R.H. (eds). Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp. 71-93.
- Richter G.L., Monshausen G.B., Krol A., Gilroy S. (2009) Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiology* **151**: 1855–1866.
- Rodríguez N.A. (2003) El cultivo de la Papaya Maradol. INIFAT. pp. 113
- Rodríguez N.A., Jiménez C.F. y Sánchez M.G. (2002) Producción Económica de papaya Maradol. Fundación Produce Puebla. ITA. INIFAT **32**: 178.
- Rodríguez N.A. y Jiménez C.F. (2004) La auténtica Papaya Maradol. (Ponencia). UTIM.-FUPPUE. Fundación Produce Puebla. FUPPUE. Izucar de Matamoros. Puebla, México. pp. 23-32.
- Rubery P.H. and Sheldrake A.R. (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* **188**: 101-121.

- Růžicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorska R., Beeckman T., Friml J. and Benkova E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* **19**: 2197–2212.
- Růžicka K., Šimášková M., Duclercq J., Petrášek J., Zažímalová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C., Benková E. (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 4284–4289.
- Suttle J.C. (1991) Biochemical bases for the loss of basipetal IAA transport with advancing physiological age in etiolated *Helianthus hypocotyls*. *Plant Physiology* **96**: 875–880.
- SAGARPA (2010) Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Consulta de Indicadores de Producción Nacional, Precios y Márgenes de Comercialización de Papaya. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Schiefelbein J.W. (2000) Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development *Plant Physiology* **124**: 1525–1531.
- SIAP (2007) Servicio de Información agroalimentaria y pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. Disponible en: www.siap.gob.mx
- Sick S., Reinker S., Timmer J., Schlake T. (2006) WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science* **314**: 1447–1450.
- Simmons C., Söll D., Migliaccio F. (1995) Circumnutation and gravitropism cause root waving in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Experimental of Botany* **46**: 143–50.
- Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K. and Bennett M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Development*. **15**: 2648–2653.

- Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Molecular Life Science* **63**: 2738-2754.
- Thimann K.V., Went F.W. (1934) On the chemical nature of the root-forming hormone of plants. *Proc Kon Akad Wetensch, Amsterdam* **37**: 456-458.
- Vanneste S. and Friml J. (2009) Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005-1016.
- Vanneste S., Rybel B., Beemster G.T.S., Liung K., Smet I.D., Isterdael G.V., Naudtsa M., Lida R., Gruijssemd W., Tasakac M., Inzéa D., Fukakic H. and Beeckmana T. (2005). Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3035-3050.
- Vieten A., Vanneste S., Wiśniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C., Friml J. (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521-4531.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Science* **12**: 160–168.
- Visser E.J.W., Heijink C.J., Van Hout K.J., Voesenek L.A., Barendse G.W., Blom C.W. (1995) Regulatory role of auxin in adventitious root formation in two species of *Rumex* differing in their sensitivity to water logging. *Physiology Plant* **93**: 23-32.
- Wample R.L. and Reid D.M. (1979) The role of endogenous auxins and ethylene in the formation of adventitious roots and hypocotyls hypertrophy in flooded sunflower plants (*Helianthus annuus*). *Physiology Plant* **45**: 219-226.
- Went F.W. (1929) On a substance causing root formation. *Proc Kon Akad Wetensch, Amsterdam* **32**: 35–39.

- Wisniewska J., Xu J., Seifertova D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquie D., Benkova E., Scheres B., Friml J. (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883.
- Yamamoto H.Y. (1964) Comparison of the carotenoids in yellow and red-fleshed *Carica papaya*. *Nature* **201**: 1049-1050.
- Yang H. and Murphy A.S. (2009) Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizo saccharomyces pombe*. *Plant Journal* **59**: 179–191.
- Yang S.F. and Hoffman N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review Plant Physiology* **35**: 155-189.
- Zazímalová E., Angus S.M., Haibing Y., Klára H., and Petrosék J. (2010) Auxin Transporters - Why So Many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **2**: a0015521-14.
- Zazímalová E., Krécěk P, Sküpa P, Hoyerová K, Petrásěk J. (2007) Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell Molecular Life Science* **64**: 1621–1637.
- Zádníková P. (2010) Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **137**: 607-617.
- Zhou Z., Engler J., Rouan D., Michiels F., Van Montagu M., Van Der Straeten D. (2002) Tissue localization of a submergence-induced ACC synthase in rice. *Plant Physiology* **129**: 72-84.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN DIFERENTES SISTEMAS *in vitro* DESARROLLADOS PARA INDUCIR LA FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN PLÁNTULAS DE *Carica papaya* L.

II.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen en el mercado semillas certificadas comerciales para la propagación del cultivo de papaya var. Maradol. El problema radica en que estas semillas solo ofrecen entre el 60 y 70% de plantas hermafroditas, que dan lugar a frutos alargados que son las de interés comercial por parte del consumidor, mientras que frutos femeninos son consumidos en el mercado local o simplemente desechados (Talavera *et al.*, 2007). En condiciones de campo se realiza el sexado de plantas para garantizar plantaciones hermafroditas, lo anterior lleva al productor a la necesidad de sembrar 3 plantas por poceta para asegurar que al menos alguna de esas plantas sembradas sea hermafrodita, luego se espera la floración que puede llevarse hasta 3 meses para conocer el sexo de la planta y posteriormente se eliminan las plantas femeninas dejando en la poceta solo la planta hermafrodita, sin embargo, estas prácticas conllevan a un gran gasto para el productor.

Entre las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales se pueden mencionar a la micropropagación o clonación *in vitro* de plantas, a la producción *in vitro* de compuestos naturales de alto valor en cultivos de células u órganos vegetales, a la obtención de materiales mejorados mediante la selección *in vitro* u otras técnicas y a la conservación de germoplasma vegetal mediante criopreservación o almacenamiento en condiciones intactas (Pérez *et al.*, 1999). Para el caso de la papaya Maradol, se puede clonar plantas que han mostrado características agronómicas sobresalientes en campo y así asegurar una homogeneidad en futuras plantaciones. Con esta técnica se puede obtener plantaciones 100% hermafroditas con frutos que son 100% alargados (Talavera *et al.*, 2009).

Aunque existen antecedentes de la propagación de *Carica papaya* L. por métodos de micropropagación como son los publicados por Drew y Miller (1993); Islan *et al.*, (1993); Magdalita *et al.*, (1997); Ramkhelawan *et al.*, (1999); Yu *et al.*, (2000), el enraizamiento *in vitro* y la aclimatación *ex vitro* son fundamentales para el establecimiento de cualquier protocolo de micropropagación. Actualmente se desarrollan protocolos para aumentar el porcentaje de sobrevivencia de plántulas, por lo anterior, la aclimatación y enraizamiento representa un problema en la micropropagación comercial (Merkle *et al.*, 1990). La mayoría de las especies cultivadas requieren un proceso de aclimatación y enraizamiento, con la finalidad de alcanzar una alta sobrevivencia de plantas vigorosas que nos permita obtener éxito en el trasplante (Hazarika, 2003).

Para superar el enraizamiento de papaya en condiciones *in vitro* se han usado fitorreguladores a base de auxinas como: IBA, ANA y AIA para inducir raíces en plántulas de papaya. El uso de IBA ha sido la mejor fitohormona utilizada en términos de porcentaje de enraizamiento y cantidad del número de raíces por plántula cuando se adiciona este fitorregulador a los medios de cultivo (Drew, 1987; Drew *et al.*, 1993). De igual forma se ha reportado por Drew *et al.*, (1993) que se pueden lograr altos porcentajes de enraizamiento en esta especie cuando se adiciona IBA a los medios de cultivo *in vitro*. También se han reportado altos porcentajes de enraizamiento superiores al 90% (Drew, 1988, 1992; Drew *et al.*, 1993) y altos porcentajes de aclimatación de hasta el 100% según lo reportado por Drew, 1988; Manshardt y Drew, 1998).

La etapa de supervivencia se trata de una etapa de transferencia de material vegetal de recipientes de cultivo a condiciones de suelo, sin embargo, esta etapa es el cuello de botella de cualquier protocolo de micropropagación debido a que las plantas propagadas *in vitro* no están bien adaptadas a un clima *in vivo* (Pierik, 1996). En este proceso las plántulas propagadas *in vitro* requieren generalmente de una fase de pre-acondicionamiento que consiste en el trasplante a un medio de cultivo con menos concentración de sales. El medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) diluido al 50% ha dado buenos resultados en diferentes especies para tener un mejor trasplante en condiciones de campo, sin embargo, en algunas especies la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Gaurab *et al.*, 2009).

II.2. HIPÓTESIS

Las vitroplantas de papaya var. Maradol expuestas a diferentes grados de impedancia en el medio durante la fase de enraizamiento *in vitro*, generarán diferentes capacidades de emisión de raíces adventicias, debido a las diferencias en la resistencia física que oponen los diferentes medios.

II.3. OBJETIVO

II.3.1. Objetivo General

- Establecer el mejor sistema que genere raíces adventicias *in vitro* en plántulas de *Carica papaya* L. var Maradol.

II.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el mejor sistema Control a partir de semillas germinadas en condiciones *in vitro*, el cual se pueda comparar con los sistemas experimentales de enraizamiento *in vitro* en plántulas de *Carica papaya* L. var Maradol.
- Caracterizar morfológicamente: las raíces formadas de las plántulas Control, contra las raíces formadas en plántulas de papaya *in vitro* provenientes de los diferentes tratamientos experimentales.

II.4. MATERIAL Y MÉTODOS

II.4.1 Material vegetal

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), en la unidad de Biotecnología. Se usaron vitroplantas obtenidas vía organogénesis directa a partir de yemas axilares de plantas adultas de papaya var. Maradol hermafrodita, conocida como la línea hermafrodita (LIH). Para los tratamientos Control se utilizaron vitroplantas obtenidas a partir de semillas de papaya var. Maradol, las cuales fueron germinadas bajo condiciones *in vitro*, a estas vitroplantas se les removió la parte radicular para posteriormente ser resembradas en nuevos medios de cultivo para inducir nuevas raíces. Todas las vitroplantas usadas no presentaron indicios de contaminación por hongos o bacterias.

II.4.2. Crecimiento y regeneración de las plántulas

Las vitroplantas fueron crecidas según lo establecido por el protocolo de micropropagación para plantas hermafroditas de papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular de la unidad de Biotecnología del CICY. Las vitroplantas provenientes de semilla (Control) y las vitroplantas utilizadas en los sistemas de enraizamiento *in vitro*, se sembraron en medio con la mitad de la fuerza iónica de MS (2.215 g L^{-1}) y con la mitad del contenido de sacarosa (10 g L^{-1}). Antes de empezar el experimento, todas las vitroplantas estuvieron en una etapa de desintoxicación durante 42 días, que consistió en exponer a las plántulas en medio MS sin la adición de fitorreguladores.

II.4.3. Condición experimental

Se utilizaron 180 vitroplantas obtenidas vía organogénesis directa las cuales se emplearon para los sistemas de enraizamiento *in vitro*. Estas plantas se distribuyeron de la siguiente manera: 30 plantas en medio líquido (LQ), 30 plantas en medio semisólido (SS) y 30 plantas en medio líquido + sustrato de fibra de roca (LQ+P) sin IBA. Las

condiciones anteriores fueron repetidas pero adicionando 2 mg L⁻¹ de IBA como se muestra en el Cuadro II.1. De igual forma se usaron semillas las cuales fueron germinadas bajo condiciones *in vitro*, las plántulas germinadas se utilizaron para obtener los tratamientos Controles; estas plantas de semillas se distribuyeron de la siguiente manera: 30 plántulas de semilla sin IBA mientras que otras 30 plántulas fueron expuestas a concentraciones de 2 mg L⁻¹ de IBA, estas plántulas Control fueron sembradas en medio semisólido con la mitad de la fuerza iónica de MS (2.215 g L⁻¹) y con la mitad del contenido de sacarosa (10 g L⁻¹) (Cuadro II.1).

Cuadro II.1. Condición experimental para establecer los diferentes sistemas a evaluar.

Vía de obtención	Tratamiento	Días de evaluación	No. de vitroplantas	MS	Sacarosa	IBA (2mg L ⁻¹)
Control	Semilla	42	30	½	½	-
	LQ		30	½	½	-
	SS		30	½	½	-
	LQ+P		30	½	½	-
Sistemas de enraizamiento	Semilla	42	30	½	½	+
	LQ		30	½	½	+
	SS		30	½	½	+
	LQ+P		30	½	½	+

SS= Semisólido, LQ=Líquido, LQ+P=Líquido + Plugs; ½= Mitad de la fuerza iónica de MS o de sacarosa; + Con IBA, - Sin IBA.

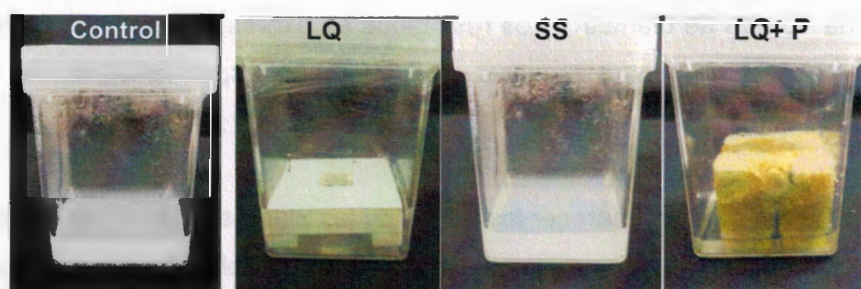


Figura II.1. Ilustración de los tratamientos de la condición experimental (Control y tres sistemas de inducción de enraizamiento). Plántulas en diferentes medios de cultivo (Control en medio semisólido con 7% de gar, sistema LQ (medio líquido sin agar) SS (Medio semisólido con 7% de agar) y LQ+P (medio líquido con el sustrato inerte (Plugs)).

II.4.4. Medición de parámetros

Las vitroplantas de todos los tratamientos fueron evaluadas cada séptimo día hasta concluir el experimento al día 42, durante este tiempo fueron estudiados parámetros como: porcentajes de germinación (solo en plantas Control), días en aparecer las raíces, longitud de las vitroplantas, número y longitud de las raíces. Para evaluar el porcentaje de germinación en plantas Control, primeramente fue usado semilla fresca de un fruto de papaya var. Maradol obtenido de una plantación comercial de papaya conocida como "Rancho Alegre" (Tizimín, Yucatán; Km 42 el Cuyo).

El fruto se lavó y se desinfectó con Cloro comercial al 20%, posteriormente en campana de flujo laminar el fruto fue nuevamente desinfectado con alcohol al 96%, seguidamente con la ayuda de un cuchillo estéril se cortó a la mitad el fruto y las semillas fueron removidas para ser sembradas en 2 diferentes medios de cultivo: el primer medio de cultivo sin contenido de IBA y el segundo con 2 mg L^{-1} de IBA; ambos medios de cultivo contenían la mitad del contenido de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) (2.215 g L^{-1}) y 7 g L^{-1} de agar como gelificante.

Para medir la impedancia mecánica (firmeza) de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) se utilizó un penetrómetro Chatillon, modelo FT 011 (John Chatillon Sons, Inc; New York, N. Y.), con una placa cilíndrica de 5 cm de diámetro y un punzón de 10 mm de diámetro. Los resultados se expresaron como la fuerza ejercida en Newton (N) necesaria para penetrar al sustrato correspondiente de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*.

Para evaluar los días en aparecer las raíces de las plantas Control y de las vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento, se monitoreó el momento en que aparecen las raíces, para ello, diariamente se monitoreaban todos los tratamientos y se registraba el día en que las raíces empezaban a surgir. Para cada tratamiento se midió el número de raíces producidas y la longitud de estas raíces. Los datos fueron registrados del día 0 hasta el día 42 cuando fue concluido el experimento.

II.5. RESULTADOS

II.5.1. Porcentajes de germinación en vitroplantas Control

En el Cuadro II.2. se indica el porcentaje de germinación de las semillas en condiciones *in vitro* (Control); (Figura II.2). Los tratamientos Control consistieron en germinar semillas enteras de papaya var. Maradol con 2 mg L⁻¹ de IBA y sin la ausencia de esta fitohormona, cabe mencionar que los tratamientos Controles fueron concluidos a los 42 días después de haberlas expuestas a condiciones *in vitro* (intuyendo poca posibilidad de germinación en semillas aún no germinadas hasta este día).

Cuadro II.2. Porcentaje de germinación de semillas Control.

% DE GERMINACIÓN		
Tratamiento Control	SIN IBA	IBA (2 mg L ⁻¹)
Semilla entera	76.67 ± 5.77	80

Los resultados obtenidos al comparar el porcentaje de germinación en los diferentes tratamientos a los 42 días de haber concluido los tratamientos nos indica que el tratamiento Semilla entera con 2 mg L⁻¹ de IBA presento el mayor número de semillas germinadas en condiciones *in vitro* (80%), en cambio el tratamiento Semilla entera sin IBA, presentó un 76.67% de germinación bajo condiciones *in vitro*. Para ambos casos, se indica que la aplicación de IBA exógena, no presenta alguna diferencia significativa durante la germinación y por lo tanto no influye en estos explantes. Por lo anterior, se considera que al no haber diferencias significativas entre ambos tratamientos se propone que el tratamiento de Semilla entera sin IBA fue el mejor tratamiento Control para germinar semillas, es necesario explicar que para cualquier protocolo de micropropagación, el no usar fitohormonas u omitirlas en etapas de propagación resulta en un menor costo y beneficia para la optimización del protocolo.

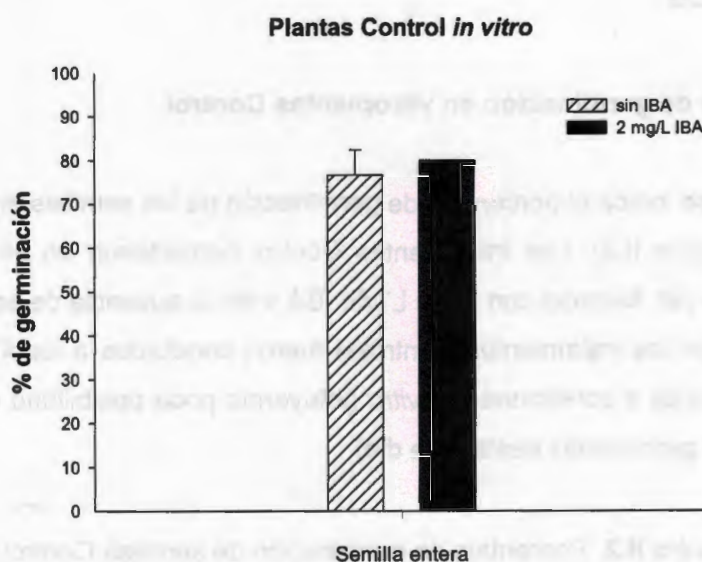


Figura II.2. Porcentaje de germinación de plantas Control (semilla) expuestas bajo condiciones *in vitro* en medio adicionado con y sin IBA. Las barras corresponde a la desviación estándar de ± 30 plantas.

En la Figura II.3 se ilustran visualmente las plantas desarrolladas en el tratamiento Control a partir de semilla entera con y sin IBA. Cabe destacar que las plantas presentaron hojas sanas, raíces principales, secundarias y terciarias, tallo delgado e igualmente en ningún tratamiento se observó indicios de contaminación y/o vitrificación.

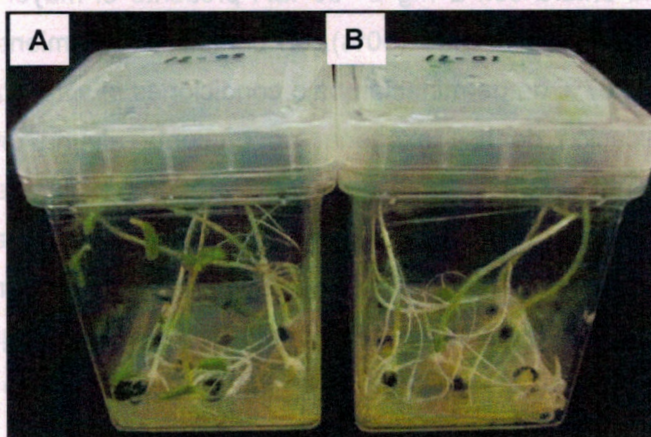


Figura II.3. Porcentaje de germinación en el tratamiento Control (semilla). **A)** Vitroplantas Control sin IBA. **B)** Vitroplantas Control con 2 mg L⁻¹ de IBA. Todas las semillas fueron sembradas con la mitad del contenido de MS (Murashige y Skoog, 1962) y 7 g L⁻¹ de agar.

II.5.2. Establecimiento de diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*

En la siguiente Figura II.4 se ilustra las condiciones experimentales que fueron utilizadas para comprender y estudiar la capacidad de brotes de papaya var. Maradol de emitir raíces, se expusieron vitroplantas a una concentración de IBA exógeno bajo 3 sistemas de enraizamiento *in vitro* que presentan diferentes grados de impedancia: sistema líquido (LQ) con 0 N de impedancia, sistema semisólido (SS) con 7.85 N y el sistema líquido adicionado con fibra de roca "plugs" (LQ+P) con una impedancia de 14.91 N. Otro objetivo de esta condición experimental fue usar las plántulas en los diferentes sistemas para poder compararlas con las plántulas Control, con la finalidad de crear una metodología idónea que nos permita estudiar genes involucrados en la formación de raíces adventicias *in vitro*.

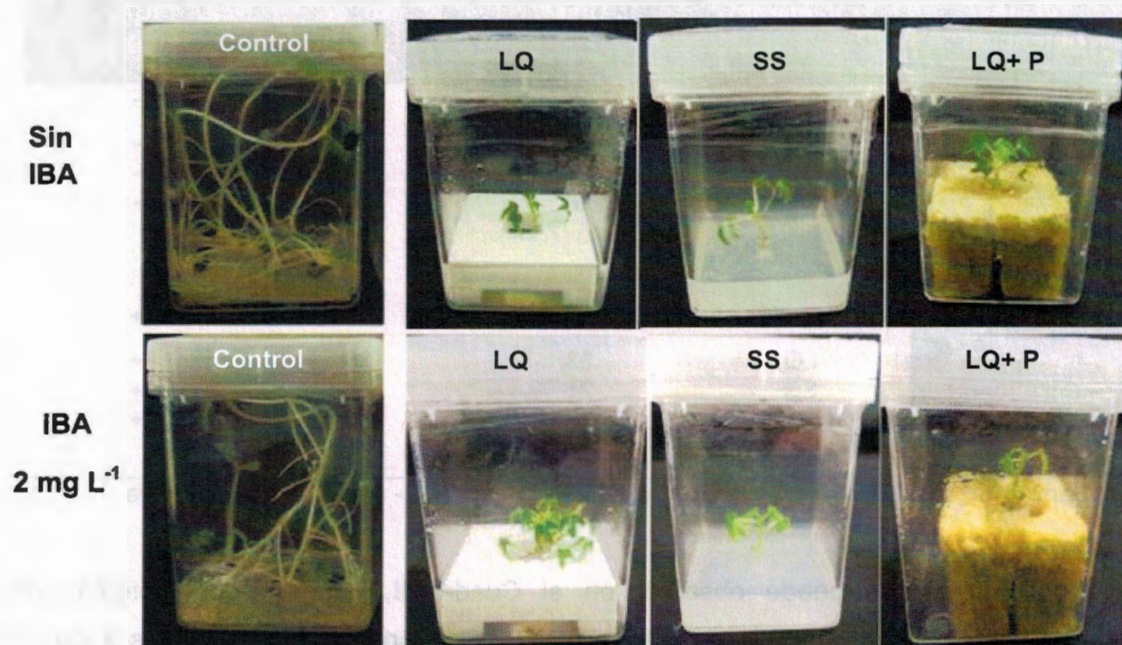


Figura II.4. Vista de la condición experimental en los tratamientos Control (semilla) y de los sistemas de enraizamiento *in vitro* (plántulas obtenidas vía organogénesis directa) sin auxina y con 2 mg L^{-1} de IBA. **A)** Plántulas Control sin IBA. **B)** Plántulas Control con IBA. **C)** Plántulas en sistemas LQ, SS y LQ+P sin IBA y **D)** Plántulas en sistemas LQ, SS y LQ+P con IBA. * LQ (medio líquido sin agar), SS (Medio semisólido con 7% de agar) y LQ+P (medio líquido con el sustrato inerte).

II.5.3. Tiempo en aparición de raíces

De manera frecuente se evaluaban todos los tratamientos hasta finalizar en el día 42. En las plantas Control se pudo observar (Cuadro II.3) que el mejor tratamiento fue cuando se cultivaron las semillas en medio semisólido con la adición de 2 mg L^{-1} de IBA, con este tratamiento las raíces aparecieron a los 16 días de haberlas sembradas, sin embargo, con el tratamiento sin la presencia de esta auxina, se presentaron las raíces hasta después de 17 días, por lo tanto, se propone este último tratamiento para inducir las raíces adventicias además de ser una opción para reducir costos en el protocolo de micropropagación.

Cuadro II.3. Tiempo (días) en aparecer las raíces en los diferentes tratamientos (Control y Sistemas de enraizamiento) en plántulas de *Carica papaya* L.

Vía de obtención	Tratamiento	Días	No. de vitroplantas	IBA 2 mg L^{-1}
Control	Semilla	16	30	-
	LQ	NR	30	-
	SS	NR	30	-
	LQ+P	NR	30	-
Sistemas de enraizamiento	Semilla	17	30	+
	LQ	33	30	+
	SS	21	30	+
	LQ+P	28	30	+

SS= Semisólido, LQ=Líquido, LQ+P=Líquido + Plugs; + con IBA, - sin IBA, NR= no raíces

De igual manera se puede observar en el Cuadro II.3 que en los sistemas de enraizamiento *in vitro*, el mejor tratamiento fue el LQ al presentarse las raíces a los 21 días de ser sembradas, seguido por el tratamiento LQ+P a los 28 días y de último el tratamiento SS con el cual aparecieron las raíces hasta los 33 días, todos los tratamientos mencionados se les adicionó 2 mg L^{-1} de IBA. Como se puede observar, con la ausencia de IBA en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* no se produjeron raíces.

En la Figura II.5 se ilustran los días en que aparecieron las primeras raíces tanto de las plantas Control como también en las plántulas expuestas bajo diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*. Contundentemente se observa que sin la adición de la fitohormona, no se producen raíces en ninguno de los sistemas de enraizamiento *in vitro*, sin embargo, en las plantas Control la fitohormona no influyó en la aparición de las primeras raíces, ya que la diferencia de un día en generar raíces no es significativo (Figura II.5).

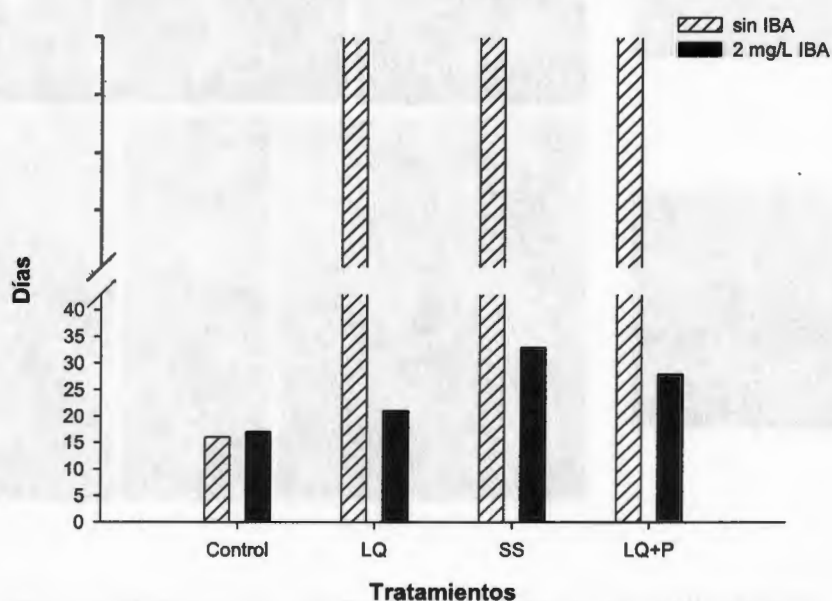


Figura II.5. Tiempo (días) en aparecer las primeras raíces en plántulas Control y en los tres diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* sin y con el contenido de IBA. La visualización de las barras con línea diagonal en los tratamientos experimentales LQ, SS y LQ+P indica que hasta el día 42 cuando terminó el experimento no hubo emisión de raíces en estos sistemas.

En la Figura II.6 se ilustran raíces de las vitroplantas en los diferentes tratamientos, Control (semilla) y tratamientos de los tres diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P). Todos los tratamientos fueron evaluados cada día y se concluye el experimento a los 42 días, especulando que existiría poca posibilidad de formación de más raíces después de 42 días de cultivo.

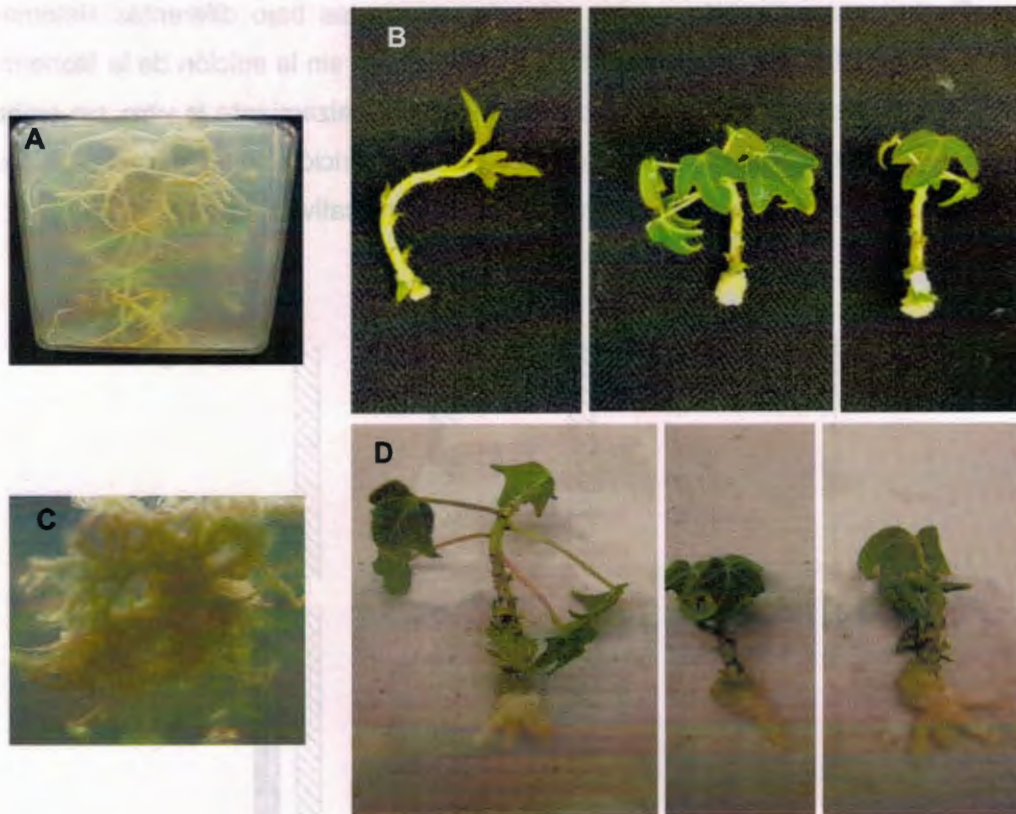


Figura II.6. Tiempo (días) en aparecer raíces en los diferentes tratamientos Control y sistemas de enraizamiento *in vitro*. **A)** Plantas Control (Semilla) sin IBA. **B)** Vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* sin IBA. **C)** Plantas Control (Semilla) con IBA y **D)** Vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* con 2 mg L⁻¹ de IBA. *(LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs).

II.5.4. Número de raíces

Como se observa en el Cuadro II.4, a las plántulas Control se les determinó el número de raíces cada siete días en los diferentes tratamientos sin y con la adición de 2 mg L⁻¹ de IBA. Los resultados indican que en los tratamientos Control sin y con IBA se generaron 12 raíces por vitroplanta, ambos tratamientos se concluyeron al día 42.

Cuadro II.4. Número de raíces en las vitroplantas Control y en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* de *Carica papaya* L. var. Maradol.

Tratamiento	Días de tratamiento							IBA (2 mg L ⁻¹)
	0	7	14	21	28	35	42	
Control	0 A	0 A	0 A	4.3± 0.57 IJ	7± 1 L	10± 0.8 N	12.3± 0.5 ñ	-
LQ	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	-
SS	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	-
LQ+P	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	-
Control	0 A	0 A	2.1 F	4 ± 0.1 I	8.3± 0.57 M	10.3± 0.57 N	12.3 ± 0.57 ñ	+
LQ	0 A	0 A	2 EF	1 ± 0C	2.3± 0.57 FG	3± 1 H	5.32± 0.57 K	+
SS	0 A	0 A	0 A	1 ± 0 C	1.3± 0.57 CD	2.3± 0.57 FG	4.6± 0.57 J	+
LQ+P	0 A	0 A	0 A	0.5± 0.57 B	1.3± 0.8 CD	1.66± 0.57 DE	2.66± 0.23 GH	+

SS= Semisólido, LQ=Líquido, LQ+P=Líquido + Plugs; + con IBA, - sin IBA. Medias con letras iguales no difieren significativamente. Pruebas de Rangos Múltiples por Tratamiento. Método: 95.0 % Duncan.

Como se ilustra en la Figura II.7, se representan gráficamente los resultados obtenidos del Cuadro II.4, para nuestro criterio, el mejor tratamiento Control en cuanto al número de raíces generadas por plántula es cuando no se le adiciona al medio de cultivo la fitohormona IBA, como ya se había mencionado con anterioridad, la no adición de fitohormonas al medio de cultivo reduce costos en el protocolo de micropropagación.

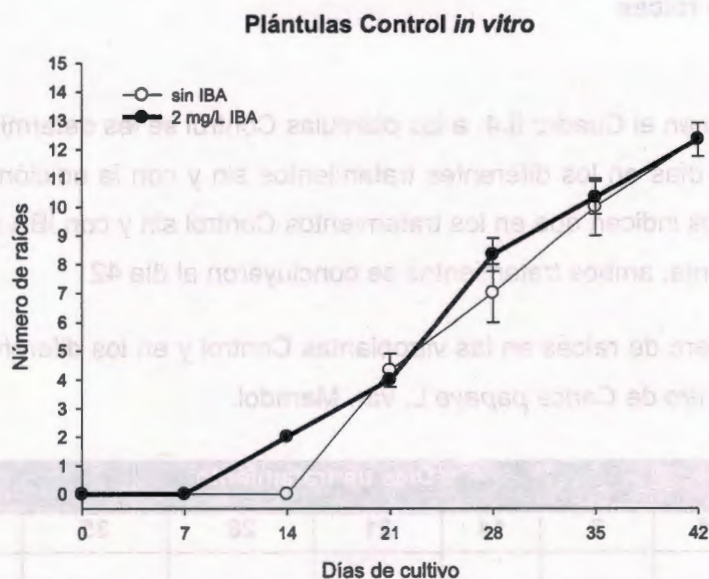


Figura II.7. Número de raíces en vitroplantas Control (semilla) evaluados cada 7 días sin y con la adición de 2 mg L^{-1} de IBA exógena.

Como se ilustra en la Figura II.8, el mejor tratamiento Control productor de raíces por plántula es el tratamiento Control (semilla) sin IBA (Figura II.8. A), con este tratamiento se obtuvo un 76% de germinación además de producir raíces más largas y por presentar una similitud en cuanto a forma comparada con raíces de papaya bajo condiciones *in vivo*.

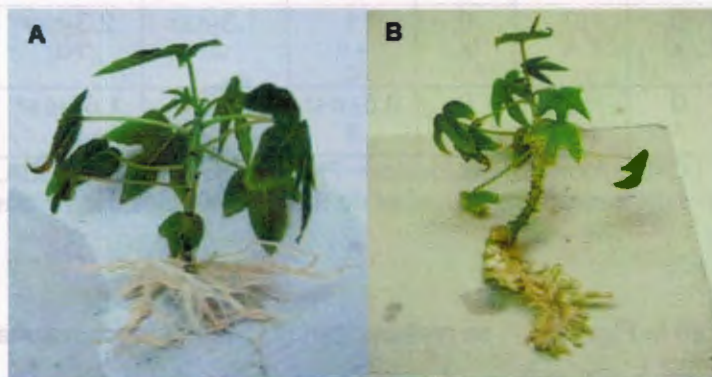


Figura II.8. Número de raíces producidas en plántulas Control (semilla entera) en los diferentes tratamientos *in vitro*. **A)** Plántulas Control sin IBA y **B)** Plántulas Control con 2 mg L^{-1} de IBA.

Como se observa en el Cuadro II.4, se evaluó el número de raíces que se producen en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) con 2 mg L⁻¹ de IBA o sin la adición de esta auxina. Las vitroplantas a las cuales se les adicionó 2 mg L⁻¹ de IBA tardaron aproximadamente 21 días para que respondieran al estímulo de dicha auxina y empezaran a generar pequeños brotes en la zona de emisión radicular que aparentan ser raíces. Sin embargo, cuando no se adiciona esta fitohormona a las vitroplantas, estas no son capaces de generar raíces. Convincentemente se observó que el mejor tratamiento que genera más cantidad de raíces es el sistema LQ con 5.32 raíces por plántula, seguido del tratamiento SS con 4.67 raíces y el último sistema productor de raíces fue el tratamiento LQ+P con 2.66 raíces por plántula; los sistemas antes mencionados contenían 2 mg L⁻¹ de IBA.

En la Figura II.9, se presentan de manera gráfica la producción de raíces en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, el mejor tratamiento fue el LQ.

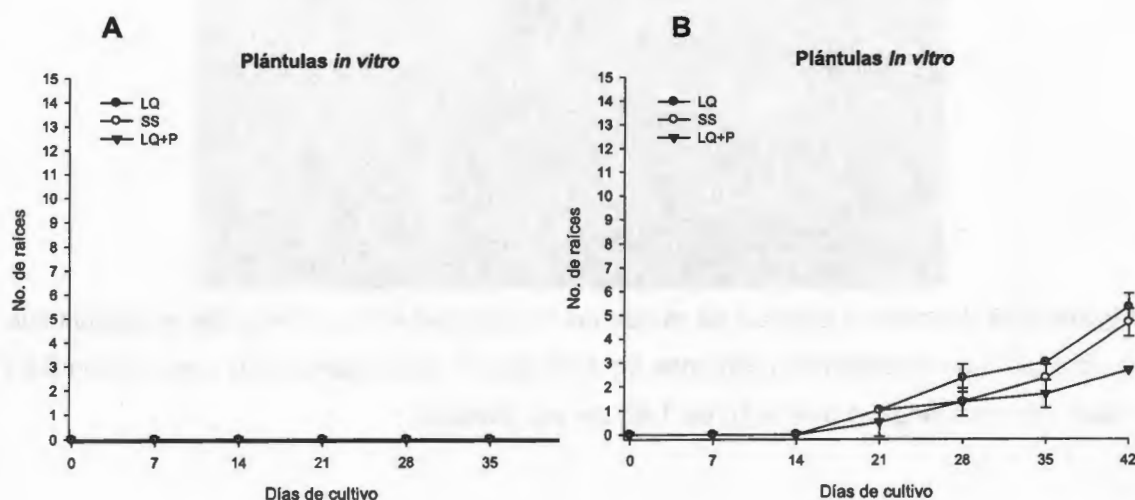


Figura II.9. Número de raíces de las vitroplantas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs) evaluados cada 7 días. **A)** Vitroplantas sin IBA y **(B)** Vitroplantas con 2 mg L⁻¹ de IBA.

En la Figura II.10, se ilustra una vitroplanta la cual estaba expuesta bajo el sistema de enraizamiento LQ (Líquido), como se observa, estas plántulas no se volvieron cloróticas después de haber pasado 42 días (2 resiembras) en este tipo de medio líquido. Las plantas cultivadas en este sistema presentaron un promedio de 4 pares de hojas y aspecto de tallo fibroso con coloración verde oscuro. Estas plántulas no presentaron algún tipo de contaminación por hongos o bacterias que pudieran afectar en la sobrevivencia de la plántula *in vitro*. Se propone este sistema de enraizamiento para ser incorporado en el protocolo de micropropagación en particular durante la etapa de enraizamiento *in vitro*.



Figura II.10. Número y longitud de raíces en vitroplantas en el sistema de enraizamiento *in vitro* LQ. Las vitroplantas cultivadas en este tipo de tratamiento (LQ) presentaron 3.33 raíces con una longitud promedio de 1.45 cm por plántula.

II.5.5. Longitud de las raíces

En el Cuadro II.5, se presentan los resultados obtenidos de longitud de raíces en plántulas Control (semilla) y de plántulas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* evaluados cada 7 días hasta terminar el experimento a los 42 días. Se midió la longitud de las raíces de las plántulas desde la base del tallo hasta la punta de la raíz. Al comparar los resultados, se demuestra que se obtienen raíces con una longitud de 6.53 en plántulas

Control cuando son expuestas a 2 mg L^{-1} de IBA, mientras tanto cuando a las plántulas no se les adiciona la auxina se obtienen raíces de 5.93 cm de largo. En el Cuadro II.5, también indica los resultados obtenidos respecto a la longitud de las raíces en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* para inducir la formación de raíces. El mejor tratamiento que produjo mayor longitud de las raíces fue el sistema LQ con 1.45 cm, seguido del tratamiento SS con 0.92 cm, mientras que el tratamiento LQ+P produjo raíces más cortas con un promedio de 0.56 cm de longitud; cabe señalar que los anteriores tratamientos contenían 2 mg L^{-1} de IBA. Los sistemas de enraizamiento (LQ, SS y LQ+P) sin auxina no produjeron raíces.

Cuadro II.5. Longitud de las raíces de vitroplantas Control y de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* en *Carica papaya* L. var. Maradol.

Tratamiento	Días de tratamiento							IBA (2 mg L^{-1})
	0	7	14	21	28	35	42	
Control	0	0	0	1.3 ± 0.1	4.6 ± 0.17	5.2 ± 0.26	5.9 ± 0.15	-
	A	A	A	G	I	J	K	
LQ	0	0	0	0	0	0	0	-
	A	A	A	A	A	A	A	
SS	0	0	0	0	0	0	0	-
	A	A	A	A	A	A	A	
LQ+P	0	0	0	0	0	0	0	-
	A	A	A	A	A	A	A	
Control	0	0	0	1.36 ± 0.2	3.56 ± 0.32	5.2 ± 0.1	6.53 ± 0.4	+
	A	A	A	G	H	J	L	
LQ	0	0	0	0.34 ± 0.2	0.45 ± 0.11	0.69 ± 0.1	1.45 ± 0.1	+
	A	A	A	BCD	CDE	EF	G	
SS	0	0	0	0	0.23 ± 0.12	0.46 ± 0.05	0.9 ± 0.17	+
	A	A	A	A	ABC	CDE	F	
LQ+P	0	0	0	0	0.13 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.56 ± 0.1	+
	A	A	A	A	AB	ABCD	DE	

SS= Semisólido, LQ=Líquido, LQ+P=Líquido + Plugs. + con IBA, - sin IBA. Medias con letras iguales no difieren significativamente. Pruebas de Rangos Múltiples por Tratamiento. Método: 95.0 % Duncan.

Como se ilustra en la Figura II.11, se representa gráficamente los resultados obtenidos del Cuadro II.5, el mejor tratamiento Control en cuanto a la longitud de raíces por plántula fue al no adicionar al medio 2 mg L^{-1} de IBA exógena.

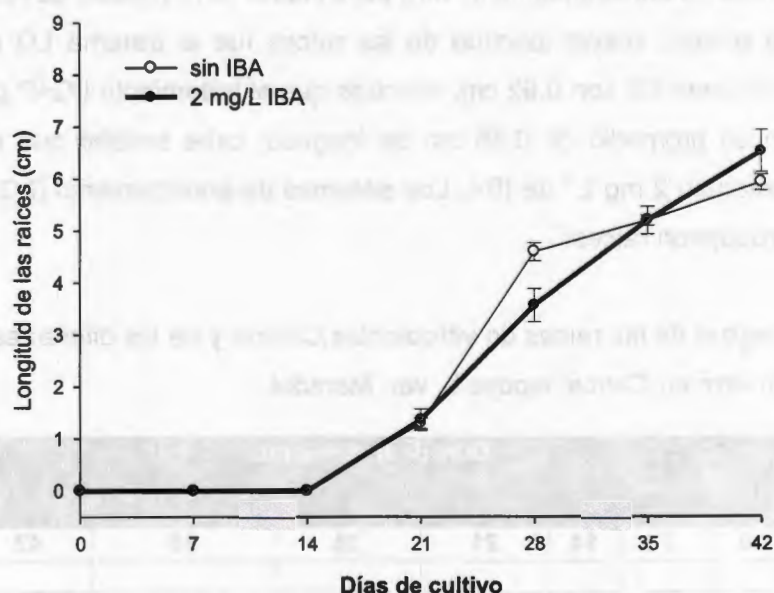
Plántulas Control *in vitro*

Figura II.11. Longitud de raíces generadas en las vitroplantas Control (semilla) después de 42 días de ser cultivadas en condiciones *in vitro* sin y con 2 mg L⁻¹ de IBA.

En la Figura II.12, se midió la longitud de las raíces en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*. Se observa que las raíces del tratamiento LQ con la adición de IBA produce raíces más largas, sin embargo, estas raíces son muy hinchadas posiblemente debido a la retención de agua del medio de cultivo, mientras que las vitroplantas en sistemas SS y LQ+P producen raíces más cortas. Se realizó la evaluación cada siete días y se concluyó el experimento a los 42 días.

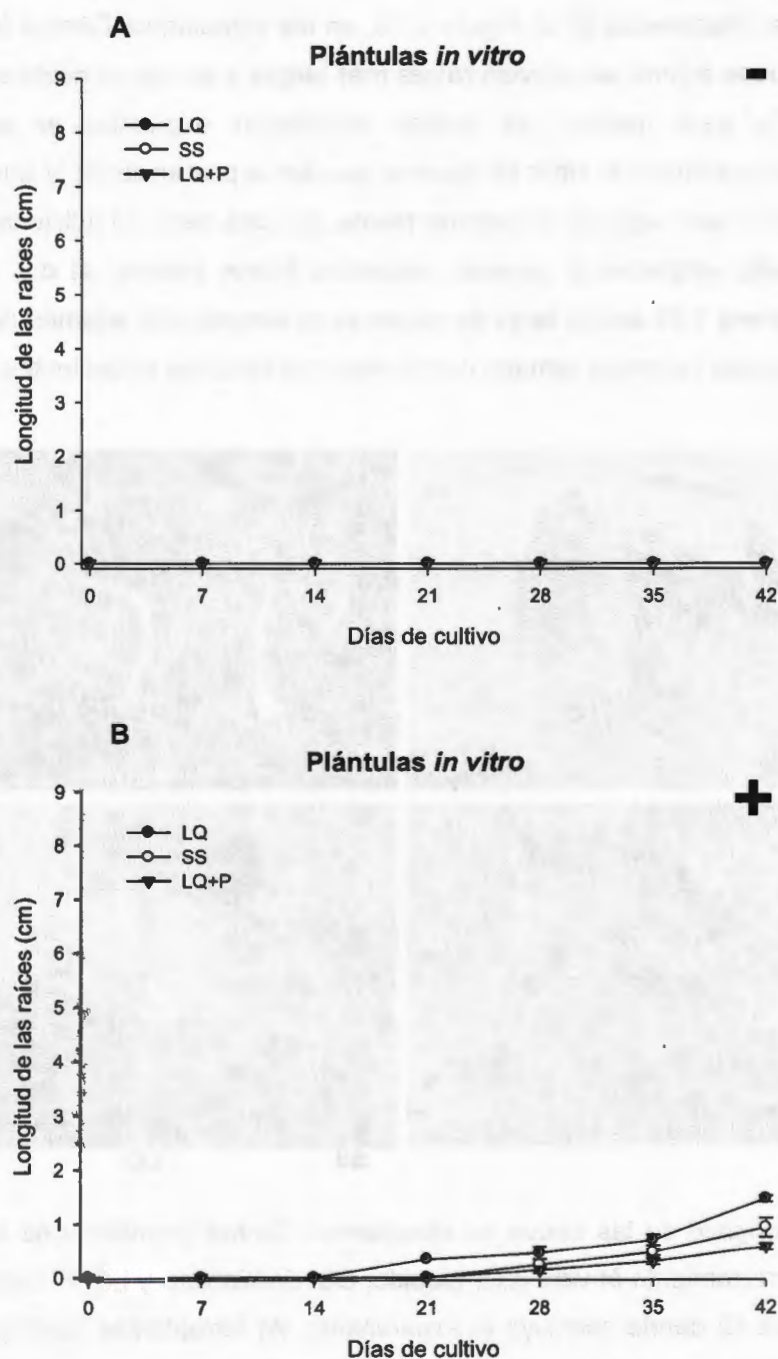


Figura II.12. Longitud de raíces de las plántulas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs) evaluadas cada 7 días. **A)** Vitroplantas sin IBA (-) y **(B)** Vitroplantas con 2 mg L⁻¹ de IBA (+).

Como se ilustra visualmente en la Figura II.13, en las vitroplantas Control (semilla) sin y con la adición de la auxina se originan raíces más largas y en mayor número para ambos tratamientos. De igual manera, se ilustran vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*; se observa que sin la presencia de la auxina exógena las vitroplantas no son capaces de generar raíces, por otra parte, al adicionar 2 mg L^{-1} de IBA, las plántulas empiezan a generar pequeños brotes (raíces) al día 21. El mejor sistema que genera 1.45 cm de largo de raíces es el sistema LQ, además de presentar a los 42 días plántulas de mayor tamaño comparado con los otros tratamientos.

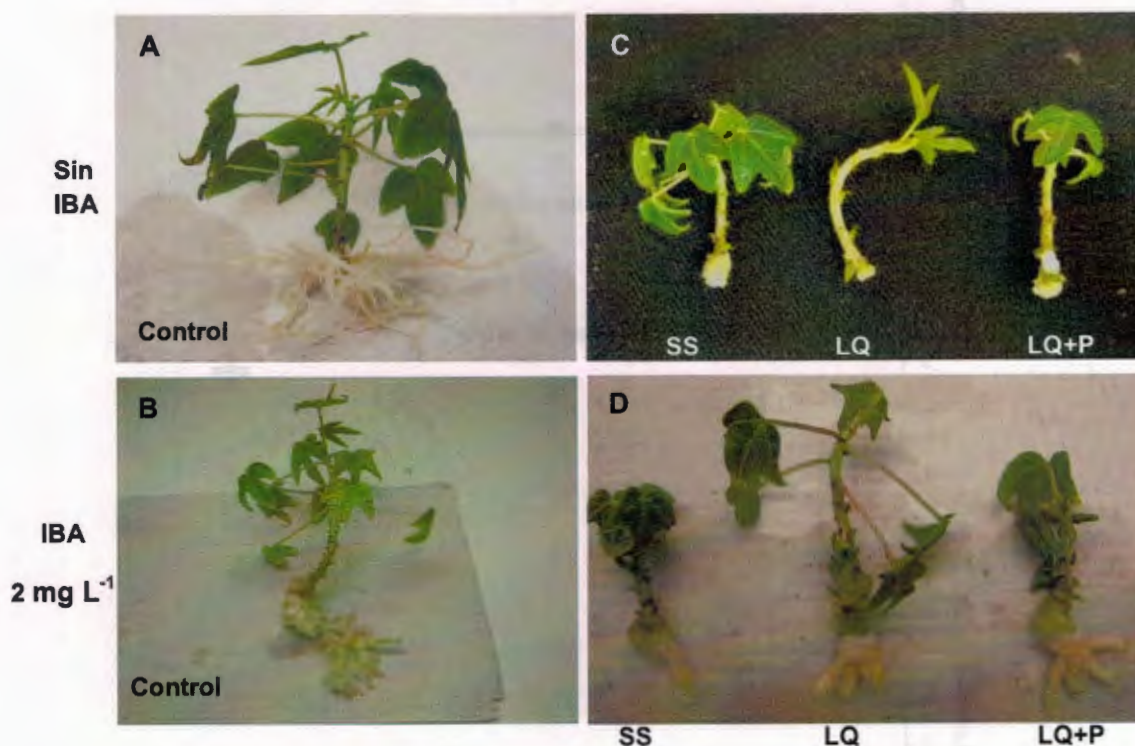


Figura II.13. Longitud de las raíces en vitroplantas Control (semilla) y de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ: Líquido, SS: Semisólido y LQ+P: Líquido + Plugs) evaluados al día 42 donde concluye el experimento. **A)** Vitroplantas Control sin IBA. **(B)** Vitroplantas Control con 2 mg L^{-1} de IBA exógena. **C)** Vitroplantas en sistemas LQ, SS y LQ+P sin IBA y **D)** Vitroplantas en sistemas LQ, SS y LQ+P con IBA.

II.6. DISCUSIÓN

Aunque algunas especies de manera fácil forman raíces adventicias *in vitro* en diferentes etapas de iniciación o de multiplicación, para muchas otras especies, como es el caso de papaya, es difícil lograr este sistema radicular; primero es necesario crecer los brotes, para posteriormente utilizar medios especiales o métodos para inducir raíces en la etapa de enraizamiento (Yu *et al.*, 2000).

Nuestro estudio está dedicado en optimizar las condiciones de enraizamiento *in vitro* debido a que la formación de raíces en plántulas de papaya durante la etapa de enraizamiento es difícil de lograr. Primeramente fue necesario conocer cuál fitorregulador y en que concentración es la idónea para producir raíces; según los reportes de Saker *et al.*, (1999) reportaron que adicionando 2 mg L⁻¹ de IBA en el medio de cultivo, obtuvieron un 75% de raíces en plántulas de papaya, así como longitudes mayores a 3.15 cm por plántula, de manera similar, Rajeevan y Pandey (1986), Drew (1988), y Mondal *et al.*, (1990) mencionan que el uso de 2 mg L⁻¹ de IBA es la concentración idónea para lograr un buen enraizamiento *in vitro* en plántulas de papaya. Mosqueda *et al.*, (2003) recomendaron la utilización de concentraciones bajas de IBA (2 mg L⁻¹) para especies de la familia *caricaceae* de difícil enraizamiento, en particular de papaya. Conjuntamente, Winnaar (1998) y Drew *et al.*, (1991) reportaron que obtuvieron buenos resultados con la aplicación de IBA durante la etapa de enraizamiento en plántulas de papaya, convirtiendo a este fitorregulador el más usado para esta especie por su estabilidad, mayor espectro de acción y menor foto-oxidación. Por lo anterior, en este trabajo se decidió utilizar 2 mg L⁻¹ de IBA como la concentración idónea para inducir la formación de raíces en plántulas de papaya var. Maradol, con 2 mg L⁻¹ de IBA se observó que todas las plántulas en su medio de cultivo formaron raíces adventicias.

De igual manera, en el presente trabajo se decidió establecer sistemas de enraizamiento *in vitro* con el firme objetivo de crear nuevos sistemas que mejoren la formación de raíces en plántulas cultivadas en los diferentes medios de cultivo. En nuestro protocolo de micropropagación hemos usado como gelificante al agar (7 g L⁻¹), sin embargo, según lo reportado por Gaurab *et al.*, (2009) mencionan que el agar en el medio de cultivo puede ser crítico para el crecimiento de plantas *in vitro* debido a que poca concentración de este

gelificante se refleja en un cultivo demasiado blando que puede producir vitrificación en las plántulas, por lo contrario, si es demasiado concentrado causa cierta dureza en el medio de cultivo ocasionando disminución o retardo en el crecimiento de las plántulas. Por lo anterior, en este trabajo de investigación tratamos de crear nuevos sistemas de enraizamiento con la finalidad de que las raíces producidas no presenten algún tipo de retardo en su crecimiento. Por otra parte, los reportes de Gangopadhyay *et al.*, (2002), mencionan que plántulas *in vitro* de coco al ser expuestas en medios líquidos con la adición de fibra de coco como sustrato, han logrado una tasa de supervivencia cercana al 100% después de haber sido trasplantadas a suelo, reportaron que el alto porcentaje de sobrevivencia se debió al enraizamiento eficaz en condiciones *in vitro*.

Asumiendo las ventajas e inconvenientes de usar agar en los medios de cultivo, así como también los beneficios que aportan los medios de cultivo líquidos con o sin sustrato, se decidió diseñar los siguientes sistemas de enraizamiento *in vitro*: medio líquido (sin agar), medio semisólido (7 g L⁻¹ de agar) y medio líquido adicionado con sustrato de fibra de roca (sin agar + plugs). En los tratamientos Controles dispusimos germinar *in vitro* semillas de papaya var. Maradol extraídas de frutas con estado de maduración fisiológica, después de la germinación, las plántulas fueron cortadas en la base del tallo y posteriormente sembradas en medios que contenían 2 mg L⁻¹ de IBA o sin la adición de este fitorregulador, con esta medida se pretendió igualar la vía de obtención de las plántulas, es decir, las vitroplantas Controles y las de los diferentes tratamientos son obtenidas vía organogénesis directa, la finalidad de esta idea fue homogenizar todos nuestros tratamientos. Se obtuvo un 80 % de germinación en vitroplantas Controles con IBA (2 mg L⁻¹) y un 76.6 % para vitroplantas Controles sin IBA. Con los resultados anteriores se considero que el tratamiento Control sin IBA fue el mejor tratamiento para inducir la germinación *in vitro*, debido a que no existe una ventaja significativa entre ambos tratamientos Controles se podría reducir los costos de micropropagación sin la presencia de este fitorregulador.

De los tres sistemas de enraizamiento *in vitro*, el medio más adecuado con el cual se obtuvieron un mayor número de raíces por plántula (6.53) y con longitudes mayores a 1.45 cm fue al utilizar el medio líquido durante un periodo de 42 días, nuestros resultados en este tipo de cultivo concuerdan con lo reportado por Rahaman *et al.*, (1992), Islan *et*

al., (1993), Vianna (1996) y Pires de Almeida *et al.*, (2000) quienes lograron longitudes de raíces con una media de 1.25 cm utilizando la misma concentración de IBA (2 mg L^{-1}), además, morfológicamente las raíces en medio líquido (LQ) parecen ser más normales y fuertes, esta diferencia ayudará a las plantas durante el trasplante y presumiblemente se reflejará en una mayor tasa de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

La capacidad de retención de humedad exclusiva de la fibra de roca (plugs) se reflejó al momento de adicionar el medio líquido, todos los nutrientes quedaron impregnados en la fibra de roca y con ello la vitroplanta lograba absorber los nutrientes para generar raíces adventicias, sin embargo, pensamos que la fibra de roca pudo ocasionar una demasía en cuanto a la resistencia mecánica (endurecimiento) debido a que los plugs ocasionó la inhibición de las raíces en vitroplantas de papaya. Por lo anterior, es necesario seguir optimizando nuevos sistemas de enraizamiento utilizando diferentes sustratos para lograr la inducción de raíces en vitroplantas de papaya, además, falta corroborar si está adición de sustratos en el medio de cultivo es un mecanismo puramente físico a través del cual las raíces crecen libremente con la fibra o existe una cadena de transducción de señales fisiológicas operando en presencia de esta impedancia mecánica (sustrato) en el medio líquido. En cuanto a los medios semisólidos con 7 g L^{-1} de agar, se observaron raíces muy hinchadas no parecidas a raíces originadas *in vivo*.

También se observó que sin la adición exógena de IBA en el medio de cultivo no se formaron raíces en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, estos resultados coinciden con los resultados reportados por Saker *et al.*, (1999) donde de igual forma demuestran la ausencia de raíces sin el uso de fitorreguladores como IBA, ANA y AIA en vitroplantas de papaya.

Nuestros resultados reflejan la necesidad de optimizar nuestro protocolo de micropropagación de papaya var. Maradol, en especial durante la etapa de enraizamiento. Utilizando medios líquidos durante la etapa de enraizamiento genera raíces parecidas a las raíces *in vivo*, al mismo tiempo es posible reducir aún más los costos de los medios de cultivo, al menos en las etapas de enraizamiento, con esta medida no sólo se ahorra el costo de añadir agentes gelificantes costosos sino que también reduce el costo de lavado y de limpieza.

Sin duda, necesitamos mucha más información antes de cualquier afirmación concluyente, pero nuestra observación experimental es muy tentadora ya que estamos llegando a la siguiente conclusión: las raíces en plántulas de papaya var. Maradol pueden aparecer utilizando 2 mg L^{-1} de IBA en los medios de cultivos líquidos a partir de los cuales se obtienen raíces parecidas a los de plantas *in vivo*. A pesar que el sistema de enraizamiento LQ+P no se obtuvo buenos resultados en relación al número de raíces, se ha indicado que los sustratos utilizados en los medios líquidos podrían ayudar a generar raíces más funcionales debido a que se trata de igualar las condiciones de suelo mediante una impedancia mecánica ejercida por los “plugs”, este tipo de imitación podría verse reflejada en una mayor tasa de sobrevivencia en condiciones *ex vitro*, por lo anterior, debemos de usar otros tipos de sustratos probablemente con menos impedancia en donde las plántulas de papaya puedan producir sus raíces adventicias.

II.7. CONCLUSIONES

- El mejor tratamiento Control fue exponer las semillas enteras bajo condiciones *in vitro* SIN IBA, la germinación fue del 76% y tardó 23 días en aparecer las raíces, a los 42 días presentó 12.33 raíces, con una longitud promedio de 6,73 cm. En las plántulas Control se produjeron raíces aún sin la aplicación de IBA exógena.
- Sin la adición de IBA exógena en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, las plántulas NO producen raíces, mientras que aplicando IBA exógeno produjo raíces en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*.
- Contrario a lo que hipotetizamos, el mejor resultado se obtuvo en el sistema con menor grado de impedancia (LQ). El mejor sistema de enraizamiento *in vitro* es el tratamiento LQ, que al día 42 se obtuvo un mínimo de seis raíces por plántula con longitudes de 1.45 cm. De hecho en este medio se obtuvieron raíces mas parecidas a las de *in vivo*.

II.8. REFERENCIAS

- Drew R.A. (1987) The effects of medium composition and cultural conditions *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.) Journal of Horticultural Science **62**: 551–556.
- Drew R.A. (1988) Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field growth trees. Horticulture Science **23**: 609-611.
- Drew R.A. (1992) Improved techniques for *in vitro* propagation and germplasm storage of papaya. Journal of Horticultural Science **27**: 1122-1124.
- Drew R.A. and Miller R.M. (1991) Effect of explant type on proliferation of *Carica papaya* L. *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **21**: 39-44.
- Drew R.A. and Miller R.M. (1993) Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. Journal of Horticultural Science **64**: 767–773.
- Drew R.A., McComb J.A. and Considine J.A. (1993) Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phase and use of riboflavin. Plant Cell Tissue and Organ Culture **33**: 1-7.
- Gangopadhyay G., Das S., Mitra S.K., Poddar R., Modak B.K., Mukherjee K.K. (2002). Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. Plant Cell Tissue and Organ Culture **68**: 301-310.
- Gaurab G., Subhash K.R. and Kalyan K.M. (2009) Plant response to alternative matrices for *in vitro* root induction. African Journal of Biotechnology **8**: 2923-2928.
- Hazarika B.N. (2003) Acclimatization of tissue-culture plants. Current Science **85**: 1704-1714.

- Islan R., Rahman S.M., Hossain M. and Joarder O.I. (1993) *In vitro* clonal propagation of papaya (*Carica papaya* L.). Pakistan Journal of Botany **25**: 189-192.
- Kataoka I. and Inoue H. (1992) Factors influence *ex vitro* rooting of tissue culture papaya shoots. Acta Horticulturae **321**: 589-586.
- Litz R.E. and Conover R.A. (1978) *In vitro* propagation of papaya. Horticultural Science **13**: 241-242.
- Magdalita P.M., Godwin I.D., Drew R.A. and Adkins S.W. (1997) Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture **49**: 93-100.
- Manshardt R.M. and Drew R.A. (1998) Biotechnology of papaya. Acta Horticulturae **461**: 65-73.
- Merkle S.A., Sotak R.J., Wiecko A.T. and Sommer H.E. (1990) Optimization of the yellow-poplar embryogenic system. In: Proceedings of the 20th Southern Forest Tree Improvement Conference **13**: 183-186.
- Mondal M., Gupta S. and Mukherjee B.B. (1990) *In vitro* propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Caricaceae) var. Honey Dew. Plant Cell Reports **8**: 609-612.
- Mosqueda R., Becerra E., Arellano G., De Los Santos F., Rosas X., Villegas A. (2003) Selección de plantas tolerantes al virus de la mancha anular del papayo (VMAP) y su clonación *in vitro*. Biotecnología Vegetal **8**: 35-41.
- Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant **15**: 473-479.
- Pérez-Molphe-Balch E., Ramírez R.M., Núñez H.P. y Ochoa N.A. (1999) Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. FOMES. pp. 51-69.

- Pierik R.L.M. (1996) Micropropagation: Technology and Opportunities. *In*: Prakash J. and Pierik R.L.M. (Eds) Plant Biotechnology Commercial Prospects and problems. Oxford IBH New Delhi Bombay Calcutta India. pp. 9-22.
- Pires de Almeida E., Pedroso de Oliveira R., Loyola J. (2000) Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **35**: 2017-2024.
- Rahaman S.M., Hossain M., Joarder O.I., Islan R. (1992) Rapid clonal propagation of papaya through culture of shoot apices. *Indian Journal of Horticulture* **49**: 18-22.
- Rajeevan M.S. and Pandey R.M. (1986) Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **6**: 181-188.
- Ramkhelawan E., Baksh G. and B. Lauckner (1999) Propagation of papaya (*Carica papaya* L.) by *in vivo* methods in Trinidad. *Journal of Tropical Agriculture* **76**: 126-130.
- Reuveni O., Shlesinger D.R., Lavi U. (1990) *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **20**: 41-46.
- Saker M.M., Bekheet S.A., Taha H.S. and Reda A.A. (1999) *In vitro* Propagation of Papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell and Tissue Culture Department* **32**:1-4.
- Talavera C., Espadas F., Contreras F. and Santamaría J.M. (2007). Field performance of 100% hermaphrodite micropropagated papaya plants. 2nd International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Riviera Maya, Mexico. pp. 219-222.
- Talavera C., Espadas F., Contreras F., Fuentes G. and Santamaría J.M. (2009) Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae* **812**: 373-378

Vianna G.R. (1996) Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas. Viçosa: UFV. 65p. Dissertação de Mestrado

Wilna D.W. (1988) Clonal propagation of papaya *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture **12**: 205-210.

Winnaar W. (1998) Clonal Propagation of papaya *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Culture **12**: 305-310.

Yu T., Yeh S., Cheng Y. and Yang J. (2000) Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture **61**: 29–35.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN *IN SÍLICO*, ESTRUCTURA Y FILOGENIA DE GENES INVOLUCRADOS EN EL TRANSPORTE DE AUXINAS DEL GENOMA SECUENCIADO DE PAPAYA TRANSGÉNICA (*Carica papaya* L.) VAR. SUN UP.**III.1 INTRODUCCIÓN**

Carica papaya es una planta con un genoma relativamente pequeño de 372 megabases (Mb), es diploide ($2n=18$) con nueve pares de cromosomas, un sistema bien establecido de transformación, además de corto tiempo de generación (9 a 15 meses) y de floración continua durante todo el año (Ming *et al.*, 2008).

Se considera la especie económicamente más importante de la familia Caricacea (Mishra *et al.*, 2007) debido a que el fruto se cultiva en forma comercial en casi todo el mundo (FAOSTAT, 2010). Sin embargo, las plantas de algunas especies incluyendo papaya, cuando son cultivadas *in vitro* presentan una eficiencia intermedia en su capacidad de enraizamiento, en este sentido, la auxina es la responsable de estimular la formación, establecimiento y arquitectura de raíces laterales o adventicias (rizogénesis), (Bohn-Courseau, 2010; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010).

La regulación de la auxina para el desarrollo de las raíces en la planta depende del control estricto de su repartición tanto en el tejido como a nivel celular, esta repartición está garantizada por familias de proteínas que se han identificado para la actividad de transporte de auxina: la familia AUX1 (transportadores de entrada) la cual está implicada en la importación de auxina y familia PINFORMED (transportadores de salida) que actúan principalmente como exportadores de auxina, ambos sistemas regulan el mecanismo de iniciación y desarrollo de las raíces laterales (Paponov *et al.*, 2005; Geisler y Murphy, 2006).

La auxina ácido indol 3-acético (AIA) y varios compuestos relacionados son hormonas clave en las plantas y tienen una multitud de efectos sobre la fisiología de las plantas, que regula, entre otros procesos, las respuestas trópicas a la luz, organogénesis y la senescencia. El transporte polarizado de la auxina en las células es esencial para el control de los niveles celulares de auxina, su generación y el mantenimiento de gradientes de auxina requeridos para estos procesos (Carrier *et al.*, 2009).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica cuatro transportadores de entrada de auxina y la entrada celular se realiza a través de genes AUX1 (AUXIN RESISTANT 1) y de sus homólogos LAX1, LAX2 y LAX3 (LIKE AUXIN resistentes), que son proteínas transmembranales con actividad permeasa altamente conservadas, participan en muchos procesos de desarrollo post-embrionarios como gravitropismo, filotaxis y la formación de raíces laterales (Marchant *et al.*, 1999; Parry *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 2002; Reinhardt *et al.*, 2003; Swarup *et al.*, 2005; Dubrovski *et al.*, 2006; Bainbridge *et al.*, 2008; Laskowski *et al.*, 2008; Swarup *et al.*, 2008). El gen AUX1 en *Arabidopsis thaliana* se caracterizó por Bennett *et al.* (1996) y su actividad como transportador de entrada con alta afinidad a la auxina se demostró por su expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus* (Yang *et al.*, 2006), la caracterización de la proteína AUX1 comprende un polipéptido de 485 aminoácidos, con una masa molecular predicha de 54 kDa (Carrier *et al.*, 2009).

Los AUX1 y sus tres genes homólogos LAX presentan entre 73% y 82% de similitud en el nivel de aminoácidos, lo que sugiere una función conservada en la absorción de auxina (Parry *et al.*, 2001). Aunque los modelos informáticos sugieren que las proteínas AUX1/LAX podrían ser cruciales para los patrones de desarrollo, hasta ahora la evidencia biológica para este papel se ha limitado a la participación de AUX1 y LAX2 en el desarrollo de las raíces (Bennett *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 2002; Kramer 2004, 2006; Swarup *et al.*, 2005; Heisler y Jonsson 2006; De Smet *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2008).

La longitud de las proteínas AUX1/LAX consta de rangos de 487 a 553 aminoácidos, además de presentar regiones centrales altamente conservadas, con 10 hélices transmembranales. Las proteínas LAX, en su N-terminal son ricas en aminoácidos ácidos y el C-terminal es rico en prolina (Swarup *et al.*, 2008).

De igual manera con la ayuda de estudios moleculares en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado ocho proteínas dentro de la familia PINFORMED, los cuales se han identificado como posibles candidatos para el transporte de salida de la auxina. Estas proteínas fueron nombrados como PIN1 a PIN8 después de la creación de la primera mutante *pin1*, la cual presentaba una pérdida de función en el transporte polar auxínico (Kemel y Offringa, 2006).

Las proteínas PIN son miembros de la familia de transportadores de salida de auxinas con funciones diversas en el crecimiento y el desarrollo de la planta. Estas proteínas se pueden clasificar en dos grupos: (1) las proteínas de tipo PIN “de distancia larga” (PIN1, 2, 3, 4, y 7) que son localizadas en la membrana plasmática (PM) las cuales participan en procesos tales como gravitropismo, fototropismo, el desarrollo del embrión, la regulación del meristemo de la raíz, la formación de gancho apical y las respuestas de evitación de sombra (Luschnig *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002a, 2002b, 2003; Keuskamp *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Rakusová *et al.*, 2011) y (2) una subfamilia que consiste de miembros de proteínas tipo PIN “de distancia corta” (PIN5, PIN6, y PIN8) los cuales carecen del gran lazo hidrofílico (Paponov *et al.*, 2005), estos últimos no se encuentran en la membrana plasmática, en cambio se propuso que su función es regular la homeostasis de la auxina entre el citoplasma y el retículo endoplasmático (Mravec *et al.*, 2009; Wabnik *et al.*, 2011).

Las proteínas de tipo PIN “de distancia larga” tienen funciones específicas en el transporte de la auxina en la raíz y una mutación de pérdida de función en el gen PIN a veces está compensada por la expresión ectópica de otros transportadores (Blilou *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005). Como resultado, solo mutantes de tipo PIN “de distancia corta” muestran fenotipos más pronunciados en la embriogénesis, elongación de raíz y en la iniciación de las raíces laterales (Benkova *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Friml *et al.*, 2003). Las proteínas PIN “largos” presentan dos conjuntos de cinco dominios trans-membranales que están unidos por lazos hidrófilos cortos y moderadamente conservados. Las proteínas PIN “de distancia larga” presentan dos regiones trans-membranales presentan un gran lazo central hidrofílico citoplasmático que contiene varias regiones conservadas (Galweiler *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998;), esta estructura de dominio es típico de las proteínas

implicadas en los procesos de transporte transmembranal (Chen *et al.*, 1998; Petrasek *et al.*, 2009).

Otro factor determinante en la orientación molecular polar de PIN es la proteína PINOID (PID) Ser/Thr quinasa. PID fue inicialmente identificado a través de los mutantes *pid* de *Arabidopsis* con pérdida de función que fenocopia en *pin1* (Bennett *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 2000). Ambas pérdidas y ganancias de función en fenotipos mutantes indicaron que PID es un regulador para el transporte de auxinas (Benjamins *et al.*, 2001). PID fue demostrado que actúa como un interruptor binario en la orientación polar apical-basal de proteínas PIN (Friml *et al.*, 2004). En células de la raíz, la sobreexpresión de PID induce un cambio de polaridad en PIN desde la base del tallo hasta la zona apical (ápice del brote), lo que conduce al crecimiento de la raíz y el colapso del meristemo de la raíz primaria, debido al agotamiento de la organización de auxina (Friml *et al.*, 2004).

La localización polar apical-basal de las proteínas PIN la cual determina la dirección del flujo de auxina es controlada por la fosforilación reversible de los lazos hidrofílicos PIN (PINHL). Se han identificado tres motivos evolutivamente conservados TPRXS (N/S) dentro del lazo hidrofílico de la PIN1 y se ha demostrado que los residuos centrales de Ser son fosforilados PINOID (PID), una proteína quinasa Ser/Thr cuya finalidad es controlar la polaridad de localización de genes PIN por fosforilación directa (Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010).

III.2. HIPÓTESIS

Los genes tipo AUX/LAX y PIN participan en el transporte de auxinas hacia las zonas meristemáticas de la raíz; por lo tanto, es probable que en *Carica papaya* existan genes homólogos a los genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* que estén involucrados en la generación de raíces adventicias en papaya.

III.3. OBJETIVOS

III.3.1. Objetivo general

- Caracterizar la estructura y filogenia de genes homólogos tipo AUX/LAX y PIN en *Carica papaya* L. var. Sun Up.

III.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar *in silico* la estructura de genes tipo AUX/LAX y PIN de *Carica papaya* L. var Sun Up.
- Alineamiento de las proteínas e identificación de dominios conservados de los genes tipo AUX/LAX y PIN de *Carica papaya* L. var Sun Up.
- Análisis filogenético de las secuencias proteínicas de genes tipo AUX/LAX y PIN de *Carica papaya* L. var Sun Up.

III.4. MATERIAL Y MÉTODOS

III.4.1. Aislamiento *in silico* de genes tipo AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana*

La búsqueda de genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* fue encontrada en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y de la base de datos del Phytozome, así mismo se procedió a realizar el aislamiento *in silicio* de dichas secuencias tipo AUX/LAX y PIN del genoma de *Arabidopsis thaliana* utilizando el programa TBLASTX, (Zhang *et al.*, 2000) con los siguientes parámetros generales: 200 secuencias blanco, expect treshold de 10, tamaño de la palabra con valor de 3 y 0 como secuencia blanco (query). Además se establecieron parámetros de puntuación utilizando la matriz de sustitución de bloques de aminoácidos (BLOSUM62), costos por la existencia de gaps con valor de 11, costos por la ampliación de gaps con valor de 1.

III.4.2. Aislamiento *in silico* de genes tipo CpAUX/LAX y CpPIN de *Carica papaya* L.

Para la búsqueda de los genes AUX/LAX y PIN homólogos en *Carica papaya* var. Sun Up se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit). Se realizó el aislamiento *in silico* de secuencias de *Carica papaya* L. que fueran homólogas a los genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* realizando un Blast Local directamente del genoma de papaya (Taxid: 3349) con el programa TBLASTX (Zhang *et al.*, 2000); se utilizó como blanco (query) la secuencia nucleotídica de los genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* bajados previamente de la base de datos del NCBI y Phytozome. Los parámetros generales del alineamiento fueron los siguientes: 500 secuencias con hits significativos para mostrar, 250 secuencias máximas de alineamientos para mostrar, un valor selectivo de (E) de 10. Además se establecieron parámetros de puntuación donde se utilizó la matriz BLOSUM62.

III.4.3. Agrupamiento y selección de secuencias tipo *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* L.

De los resultados obtenidos por el programa BioEdit (Hall, 1999), se agrupó y seleccionó las secuencias con mayor homología utilizando el programa Blast Parser v1.2 (<http://geneproject.altervista.org/>). Se eligieron las secuencias que presentaran los siguientes parámetros: secuencias codificantes con valores de $E < 10^{-14}$, secuencias con porcentajes de identidad y similitud superiores a 60% dentro del genoma de papaya (*Carica papaya*) var. Sun Up. Las secuencias seleccionadas se tradujeron en los seis marcos de lectura posibles, usando el programa de algoritmos de predicción de genes FGENESH (<http://linux1.softberry.com/all.htm>). Las secuencias AUX/LAX y PIN de *Carica papaya* L. fueron posteriormente corroboradas al ser buscadas dentro de la base de datos del programa bioestadístico de Phytozome (<http://www.phytozome.net>).

III.4.4. Predicción de ORF

Para la predicción de los marcos de lectura abiertos (ORF; Open Reading Frame) se utilizó el programa bioestadístico FGENESH (Softberry, Inc.) utilizando el código genético de plantas dicotiledoneas (*Arabidopsis*). El programa predijo los ORF de las secuencias obtenidas con ayuda del programa TBLASTX (Zhang *et al.*, 2000); estas secuencias proteínicas predichas fueron editadas con el programa TRANSLATE (Swiss Institute of Bioinformatics) con el formato de salida que incluye la secuencia proteínica.

III.4.5. Alineamiento de secuencias proteínicas predichas e identificación de dominios conservados de genes *AUX/LAX* y *PIN* de *Arabidopsis thaliana* y *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* var. Sun Up.

Se procedió a realizar un alineamiento múltiple de las secuencias proteínicas de genes tipo AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* (*AtAUX1*, *AtLAX1*, *AtLAX2*, *AtLAX3*, *AtPIN1*, *AtPIN2*, *AtPIN3*, *AtPIN4*, *AtPIN5*, *AtPIN6*, *AtPIN7* y *AtPIN8*) y de genes encontrados en *Carica papaya* (*CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2*, *CpLAX3*, *CpPIN1*, *CpPIN2*, *CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5* y *CpPIN6*) utilizando el programa MEGA5.

III.4.6. Análisis filogenéticos de las secuencias de genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* y CpAUX/LAX y CpPIN de *Carica papaya*

Para el análisis filogenético se consideró las secuencias de proteínas y de nucleótidos más probables; se realizaron los alineamientos de las secuencias y se construyó el árbol filogenético a partir de las secuencias de genes de *AtAUX/LAX* y *AtPIN* de *Arabidopsis thaliana*; de igual forma se construyó otro árbol filogenético de las secuencias *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya*. Ambos árboles se construyeron con la ayuda del programa MEGA 5 utilizando el método de distancia Neighbour Joining, se realizó una prueba de Bootstrap con 1000 réplicas, detección completa de Gap y datos perdidos y con una contribución uniforme de los sitios.

III.4.7. Diseño de oligonucleótidos de genes *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* L.

Los oligonucleótidos para análisis de expresión (mediante RT-PCR) a partir de las secuencias homólogas de genes *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de papaya (*Carica papaya*) var. Sun Up fueron diseñados mediante los siguientes criterios de selección: los oligonucleótidos se diseñaron procurando que tuvieran una longitud no mayor a 22 bases, con un Tm mayor de 50° C y una proporción de GC del 50%. Se buscó que el amplicón se encontrara en la zona central de la secuencia predicha y que atravesará al menos un intron.

III.5. RESULTADOS

III.5.1. Identificación *in silico* de genes tipo AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana*

Para comprender mejor los mecanismos moleculares que sustentan el fenotipo de la raíz, se identificaron los números de accesoión en la base de datos del NCBI, en total de la familia de los genes AUX/LAX y de los genes PINOID (PIN), los cuales constan de 4 miembros para genes AUX/LAX y de ocho miembros de la familia PIN en *Arabidopsis thaliana*. En el Cuadro III.1. se muestran los genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* y de igual manera los Locus de la base de datos del NCBI.

Cuadro III.1. Secuencias tipo AUX/LAX y PIN y locus en *Arabidopsis thaliana* obtenidas de la base de datos del NCBI.

GENES	LOCUS
AUX/LAX (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	
AUX1 <i>A. thaliana</i> auxin transporter protein 1	NM_129368
LAX1 <i>A. thaliana</i> auxin transporter-like protein 1	NM_120202
LAX2 <i>A. thaliana</i> auxin transporter-like protein 2	NM_127675
LAX3 <i>A. thaliana</i> auxin transporter-like protein 3	NM_106418
PIN (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	
PIN1 auxin efflux carrier component 1	AT1G73590
PIN2 auxin efflux carrier component 2	AT5G57090
PIN3 auxin efflux carrier component 3	AT1G70940
PIN4 auxin efflux carrier component 4	AT2G01420
PIN5 putative auxin efflux carrier component 8	AT5G16530
PIN6 putative auxin efflux carrier component 6	AT1G77110
PIN7 auxin efflux carrier component 7	AT1G23080
PIN8 putative auxin efflux carrier component 5	AT5G15100

III.5.2. Análisis filogenético de las secuencias de genes tipo *AUX/LAX* y *PIN* de *Arabidopsis thaliana*

El árbol filogenético mostrado en la Figura III.1 muestra la relación de las secuencias de genes tipo *AtAUX/LAX* y *AtPIN* de *Arabidopsis thaliana*. El árbol que representa las secuencias de transportadores de entrada de auxina (*AUX/LAX*), se observan dos grupos o clados distinguibles, de los cuales, la secuencias de *AtAUX1* y *AtLAX1* están en el mismo clado, posteriormente en otro clado están las secuencias de genes *AtLAX2* y *AtLAX3*. El árbol que representa las secuencias de transportadores de salida de auxina (*PIN*), se pueden observar varios subclados, de los cuales los genes *AtPIN3*, *AtPIN7* y *AtPIN4* están en un mismo subclado, de igual forma *AtPIN2* y *AtPIN1* se encuentran relacionados en otro subclado. Cabe mencionar que las secuencias de genes tipo *AtPIN8*, *AtPIN6* y *AtPIN5* se encuentran en subclados distantes. Los grupos que componen al árbol filogenético de cada transportador se encuentran respaldados con valores de estimación de precisión (bootstrap) elevados.

Para el caso de secuencias tipo *AUX/LAX* de *Arabidopsis thaliana*, la filogenia evolutiva fue deducida utilizando el método de Maximum basado en el modelo General Reversible Chloroplast. La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados en las secuencias de *Arabidopsis*. Las ramas correspondientes a las particiones indican que menos del 50% de las réplicas de bootstrap son colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles cuando se asocian con taxones agrupados muestran la réplica de bootstrap de 1000 réplicas al lado de las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente como se indica a continuación. Cuando el número de sitios comunes era <100 o menos que una cuarta parte del número total de sitios, la Maximum Parsimony fue utilizado, de lo contrario el método BIONJ con distancia de matriz MCL se utilizó. Una distribución gamma discreta se utiliza para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios (5 categorías (+ G, el parámetro = 0.3780)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medida en el número de sustituciones por sitio. Se analizaron 4 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen algunos datos faltantes fueron eliminados. Hubo un total de 429 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA5 (Figura III.1. A).

En genes tipo **PIN** de *Arabidopsis thaliana*, la filogenia de la historia evolutiva fue deducida por el método de Maximum Likelihood basado en el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano. La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a las particiones indican que en menos del 50% de las réplicas de bootstrap son colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles cuando se asocian con taxones agrupados muestran la réplica de bootstrap de 1000 réplicas al lado de las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtiene automáticamente de la siguiente manera: cuando el número de sitios comunes era <1000 o menos de una cuarta parte del número total de sitios, el método de maximum parsimony se utilizó, de lo contrario el método BIONJ con una distancia matriz MCL hubiera sido utilizado. Una distribución Gamma discreta fue usada con el modelo de diferencias evolutivas entre tasas de sitios [5 categorías (+G, parámetro=3,2519)]. Los árboles dibujados a escala, con una longitud de ramas que mide el número de sustituciones por sitio. Para el análisis se diseñó un árbol que incluyó cuatro secuencias de nucleótidos de genes tipo AUX/LAX y otro árbol con ocho secuencias de nucleótidos de tipo PIN, ambos árboles de *Arabidopsis thaliana*. Todas las posiciones que contienen gaps y los datos que faltan fueron eliminadas. Hubo un total de 849 posiciones en la base de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo con el programa MEGA5 (Figura III.1. B).

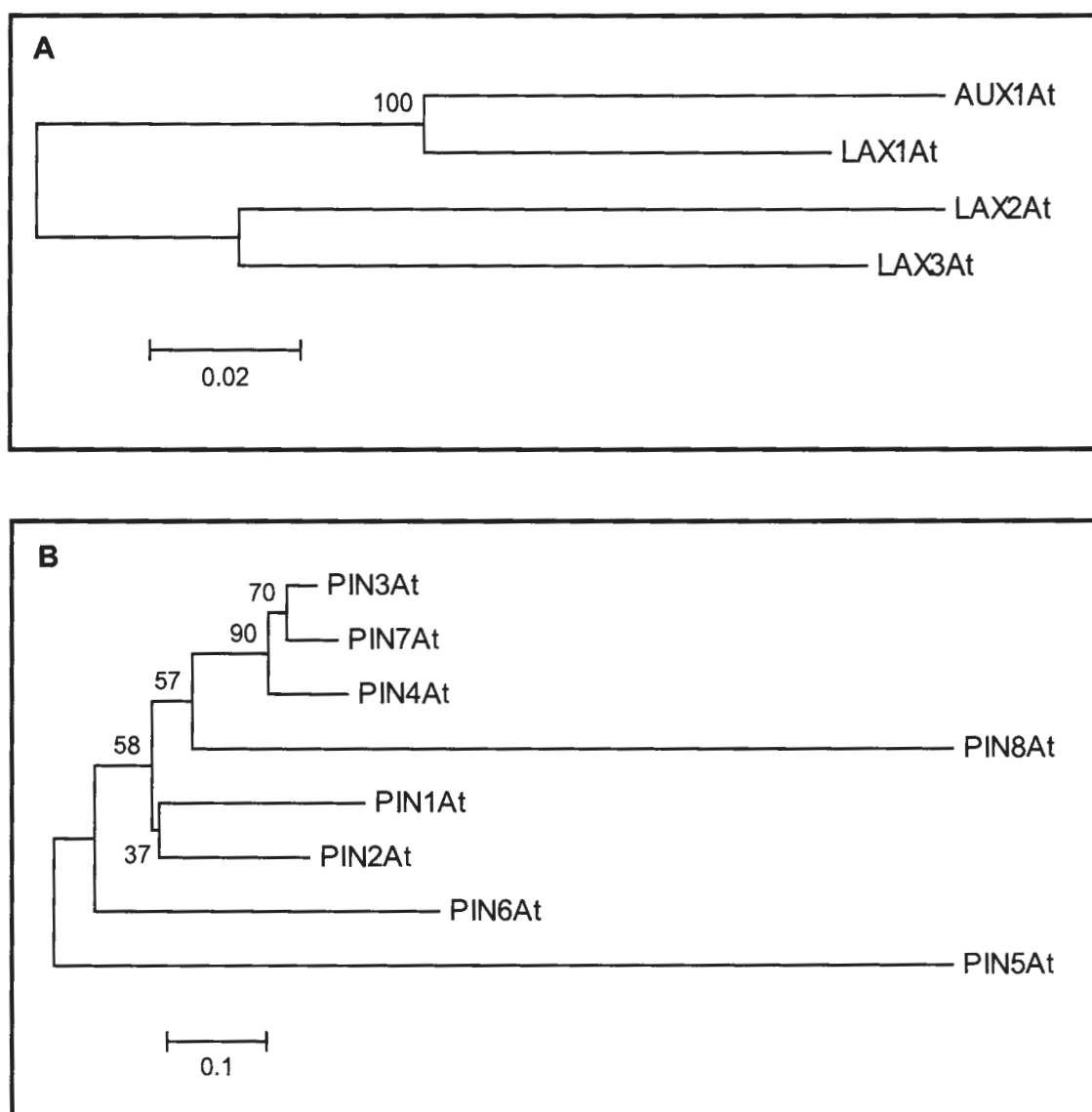


Figura III.1. Árbol filogenético donde se muestra las secuencias de genes transportadores de auxinas de *Arabidopsis thaliana*. **A)** Árbol filogenético de genes tipo AtAUX/LAX (transportadores de entrada) y **B)** Árbol filogenético de genes tipo AtPIN (transportadores de salida).

III.5.3. Identificación *in silico* de genes tipo AUX/LAX y PIN en *Carica papaya* L.

A partir del genoma de *Carica papaya* var. Sun Up, se encontraron con el programa TBLASTX cuatro secuencias tipo AUX/LAX y seis secuencias tipo PIN. Todas las secuencias presentan porcentajes de identidad del 66 al 95%, así como también porcentajes de similitud del 75 al 100% y un Valor Esperado (E) $<7E^{-11}$ a $<1E^{-180}$. Las secuencias en papaya var. Maradol fueron nombradas para genes tipo AUX/LAX: *CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2*, *CpLAX3* y para genes tipo PIN: *CpPIN1*, *CpPIN2*, *CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5* y *CpPIN6* como se observa en el Cuadro III.2.

Cuadro III.2. Genes de *Carica papaya* que presentaron homología significativamente alta con los genes AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana*.

GENES	Nombre de secuencias encontradas	Longitud del segmento (bp)	Longitud del alineamiento (aa)	% de Identidad	% de Similitud	Valor E	Score
AUX/LAX							
<i>CpAUX1</i>	supercontig_1125.1	1233	1023	95	100	$8E^{-12}$	233
<i>CpLAX1</i>	supercontig_19.209	1413	1134	95	95	$1E^{-11}$	232
<i>CpLAX2</i>	supercontig_36.16	1398	1229	95	100	$7E^{-11}$	176
<i>CpLAX3</i>	supercontig_37.169	1476	1278	86	91	$7E^{-11}$	194
PINs							
<i>CpPIN1</i>	contig_35483.1	2270	1056	80	85	$1E^{-175}$	1330
<i>CpPIN2</i>	supercontig_115.56	1961	1932	67	80	$1E^{-152}$	600
<i>CpPIN3</i>	supercontig_92.84	2270	1734	66	75	$1E^{-142}$	685
<i>CpPIN4</i>	supercontig_65.140	2353	1332	91	96	$1E^{-180}$	1032
<i>CpPIN5</i>	contig_26337.3	1056	1029	78	92	$1E^{-168}$	705
<i>CpPIN6</i>	supercontig_14.40	2353	1074	67	79	$1E^{-131}$	560

Todos los genes AUX/LAX y PIN encontrados en *Carica papaya* L. a partir del Blast Local realizado por el programa BioEdit y confirmado en el programa bioestadístico Phytozome, se comprueba que todos los genes AUX/LAX y PIN homólogos de *Carica papaya* L. se repiten en todos los miembros de la familia de genes tipo AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana*.

III.5.4. Alineamiento de proteínas tipo AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* y AUX/LAX y PIN de *Carica papaya*

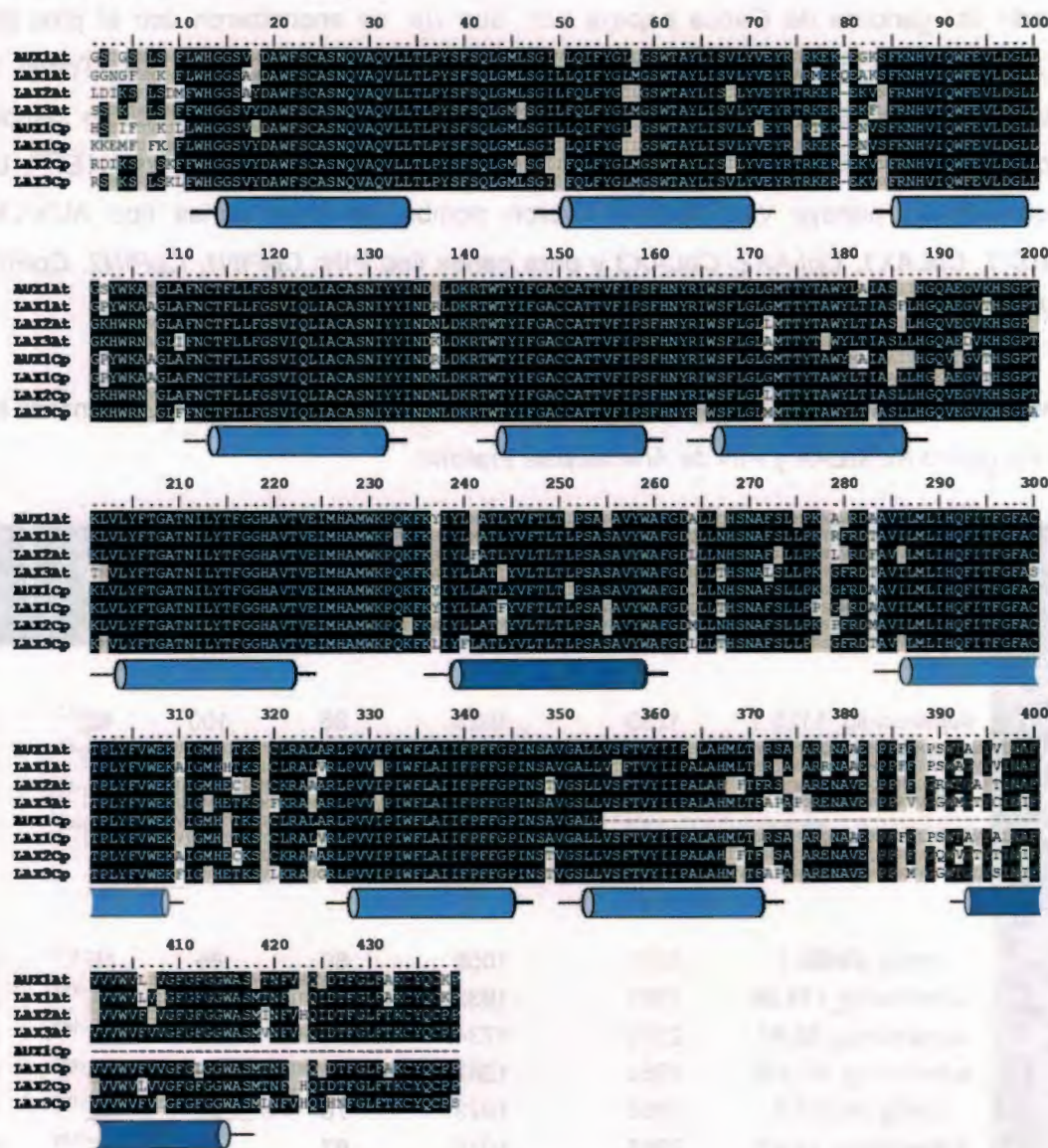
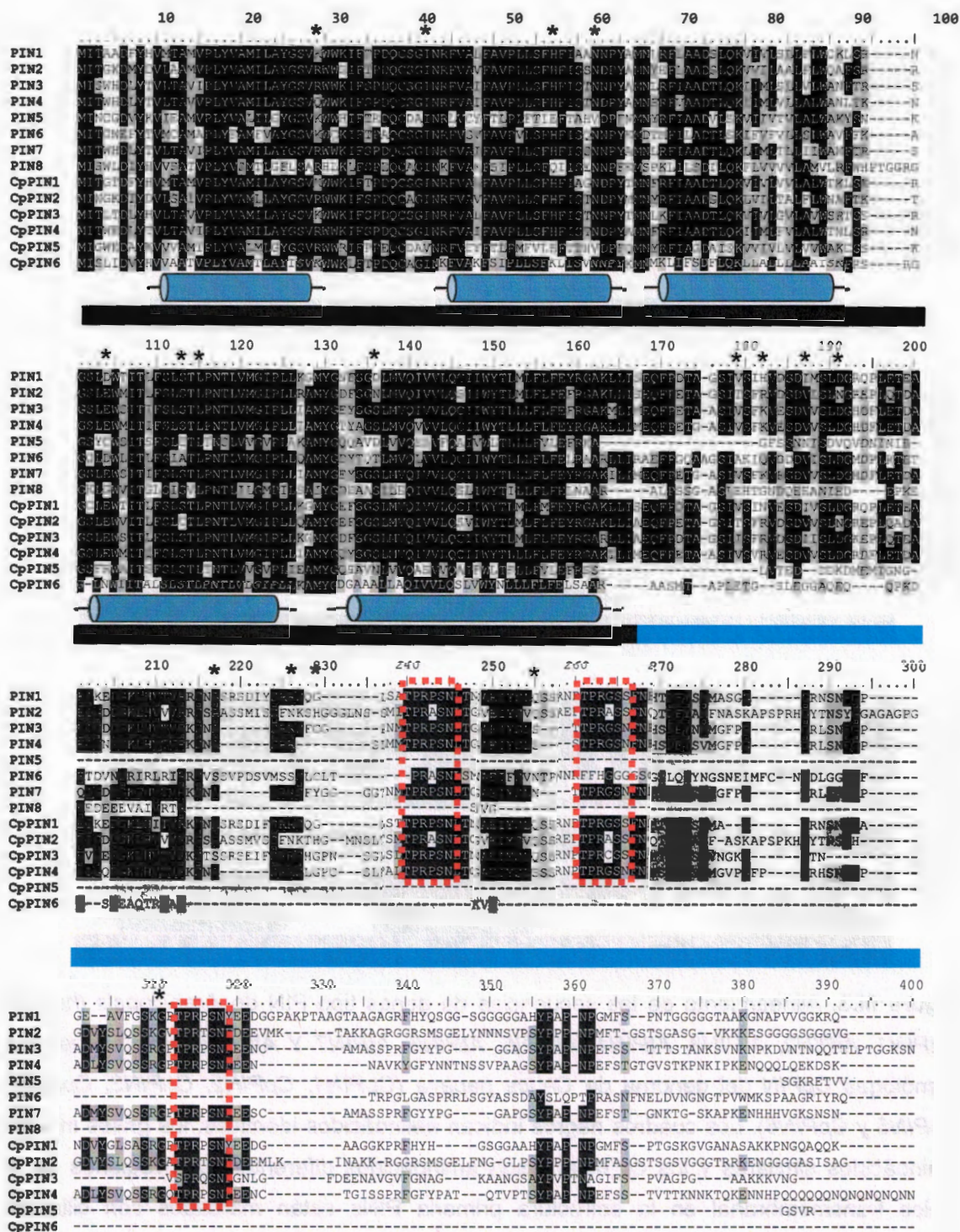


Figura III.2. Alineamiento de las secuencias de genes AUX/LAX de *Arabidopsis thaliana* (*AtAUX1*, *AtLAX1*, *AtLAX2* y *AtLAX3*) y de secuencias homólogas del genoma de *Carica papaya* (*CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2* y *CpLAX3*). Los cuadros negros indican aminoácidos idénticos, los cuadros en gris indican aminoácidos similares y los de blanco son aminoácidos diferentes. Las regiones de la hélice transmembranal en la estructura primaria de las proteínas AUX/LAX están marcadas con cilindros azules.



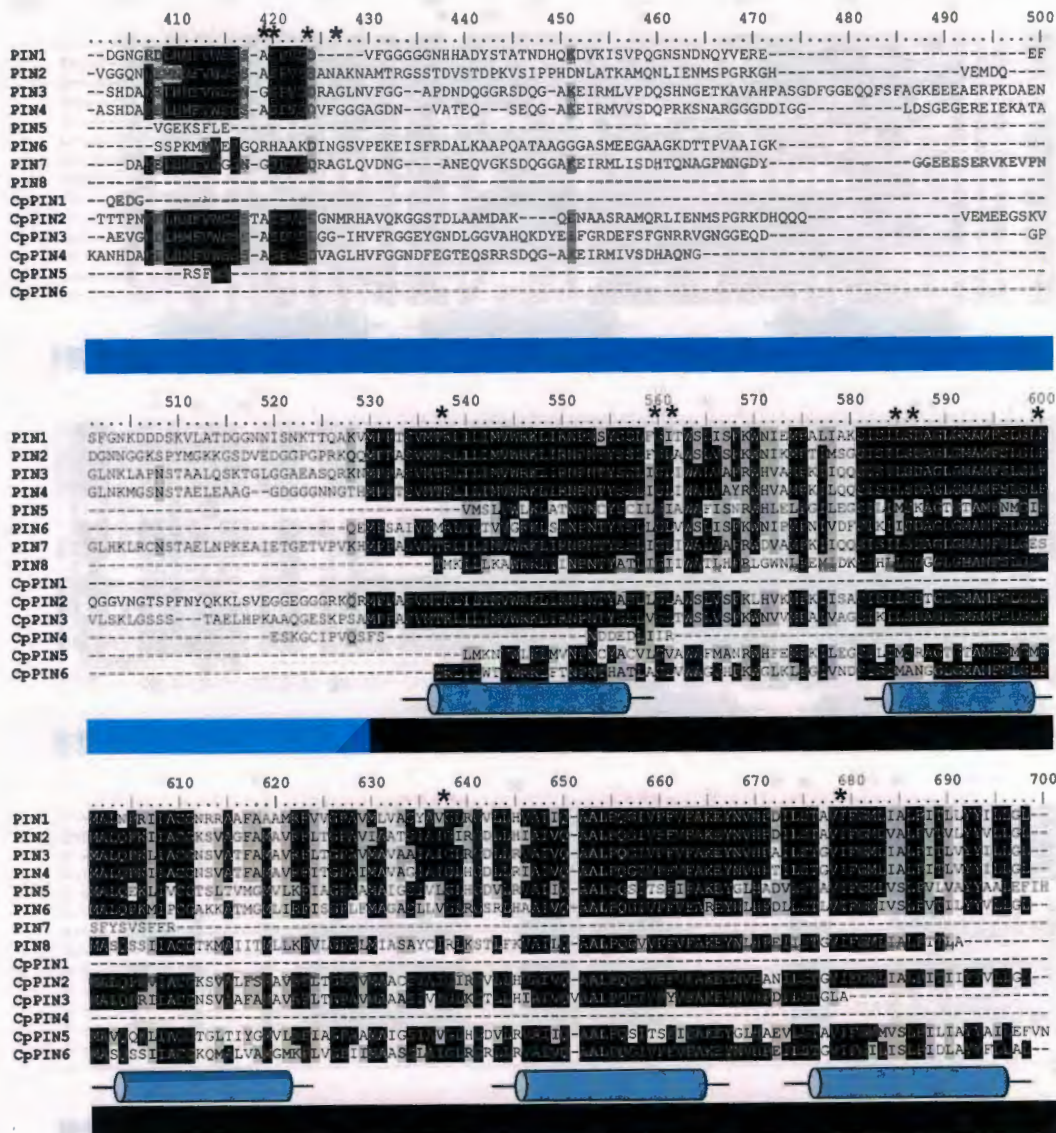


Figura III.3. Alineamiento de las secuencias de genes tipo PIN de *Arabidopsis thaliana* (AtPIN1, AtPIN2, AtPIN3, AtPIN4, AtPIN5, AtPIN6, AtPIN7 Y AtPIN8) y de secuencias homólogas CpPIN del genoma de *Carica papaya* (CpPIN1, CpPIN2, CpPIN3, CpPIN4, CpPIN5 y CpPIN6). Los cuadros negros indican aminoácidos idénticos, los grises indican aminoácidos similares y los de blanco son aminoácidos diferentes. Las regiones de la hélice transmembranral en la estructura primaria PINs están marcadas con cilindros azules, el dominio hidrofóbico con barra negras y el lazo hidrofílico con barra azul. Los dominios conservados TPRXS de las proteínas PINs están indicados en el recuadro rojo. En asterisco se indica los residuos de Serina característicos de los genes PINs.

III.5.5. Porcentajes de identidad de las secuencias tipo *AUX/LAX* y *PIN* de *Carica papaya* L.

Se llevó a cabo la determinación de los porcentajes de identidad de las secuencias proteínicas *AtAUX/LAX* y *AtPIN* de *Arabidopsis thaliana* en relación con las secuencias *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* L. Para los transportadores de entrada (*AUX/LAX*) en el Cuadro III.3 muestra que *CpAUX1* mostró mayor identidad con *AtAUX1* y (95.1 %). Sin embargo, para *CpLAX1* muestra alta identidad con *AtAUX1* y también con *AtLAX1* (93.2 y 92 %) respectivamente. Mientras que *CpLAX2* mostró un 94.3 % con *AtLAX2* y finalmente *CpLAX3* presentó un 88.1 % de identidad en relación a *AtLAX3*. Se señala que la fuerte identidad de las secuencias *AtAUX1* y *AtLAX1* de *Arabidopsis thaliana* en comparación con las secuencias *CpAUX1* y *CpLAX1* de *Carica papaya* L., es debido a que presentan una homología mayor al 80 % según lo reportado en la literatura en secuencias nucleotídicas de *Arabidopsis thaliana*.

Cuadro III.3. Porcentajes de identidad entre las cuatro secuencias *AtAUX/LAX* de *Arabidopsis thaliana* y las cuatro secuencias de la familia de genes *CpAUX/LAX* de *Carica papaya*.

	AUX1	LAX1	LAX2	LAX3
<i>CpAUX1</i>	95,184136	86,1189802	86,6855524	77,9036827
<i>CpLAX1</i>	93,2011331	92,0679887	88,3852691	84,9858357
<i>CpLAX2</i>	82,7195467	88,9518414	94,3342776	87,8186969
<i>CpLAX3</i>	58,9235127	78,7535411	84,7025496	88,101983

Las secuencias *CpPIN1* y *CpPIN3* alcanzaron mayor identidad con *AtPIN1* (89.08 y 83.91 % respectivamente), *CpPIN2* mostró mayor identidad con *AtPIN2* con un 85.06%, para *CpPIN4* se observó que presenta mayor identidad para *AtPIN3* y también para *AtPIN4* (91.38 y 91.95% respectivamente), *CpPIN5* mostró un 65.52% de identidad en *AtPIN5*, mientras que para *CpPIN6*, el máximo porcentaje de identidad (60.92%) está implicado con *AtPIN8*. (Cuadro III.4.).

Cuadro III.4. Porcentajes de identidad entre las ocho secuencias tipo *AtPIN* de *Arabidopsis thaliana* y las seis secuencias de la familia de genes *CpPIN* de *Carica papaya* L.

	PIN1	PIN2	PIN3	PIN4	PIN5	PIN6	PIN7	PIN8
<i>CpPIN1</i>	89,08	79,89	77,01	79,89	52,30	67,24	77,01	45,98
<i>CpPIN2</i>	75,86	85,06	78,16	77,01	48,85	63,79	78,16	48,28
<i>CpPIN3</i>	83,91	78,74	80,46	79,31	50,00	65,52	80,46	49,43
<i>CpPIN4</i>	79,31	79,31	91,38	91,95	50,00	64,37	90,80	47,13
<i>CpPIN5</i>	45,40	49,43	47,70	46,55	65,52	40,23	46,55	33,91
<i>CpPIN6</i>	55,75	56,32	56,90	56,32	42,53	51,72	57,47	60,92

III.5.6. Análisis filogenético de las secuencias de genes transportadores de entrada *AtAUX/LAX* y *CpAUX/LAX*; y genes transportadores de salida *AtPIN* y *CpPIN*

El árbol filogenético mostrado en la Figura III.4. y III.5. muestra la secuencia de genes tipo *AtAUX/LAX* y *AtPIN* de *Arabidopsis thaliana* y de genes *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* L., los árboles presentan grupos distinguibles. Cada uno de estos grupos muestra secuencias de genes de *Arabidopsis thaliana* agrupados con las secuencias de genes de *Carica papaya* L. Los grupos que componen los árboles filogenético se encuentran respaldados con valores de bootstrap elevados.

Para el caso de secuencias tipo *AtAUX/LAX* y *CpAUX/LAX*, la historia evolutiva fue deducida por el método de Maximum Likelihood basado en el modelo de Whelan y Goldman. La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a las particiones indican que en menos del 50% de las réplicas de bootstrap son colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles cuando se asocian con taxones agrupados muestran la réplica de bootstrap de 1000 réplicas al lado de las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente como se indica a continuación. Cuando el número de sitios comunes era <100 o menos que una cuarta parte del número total de sitios, la Maximum Parsimony fue utilizado, de lo contrario el método BIONJ con distancia de matriz MCL se utilizó. Una distribución gamma discreta se utiliza para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios

(5 categorías (+ G, el parámetro = 0,2697)). El análisis incluyó 8 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen algunos datos faltantes fueron eliminados. Hubo un total de 353 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevó a cabo en MEGA5 (Figura III.4.).

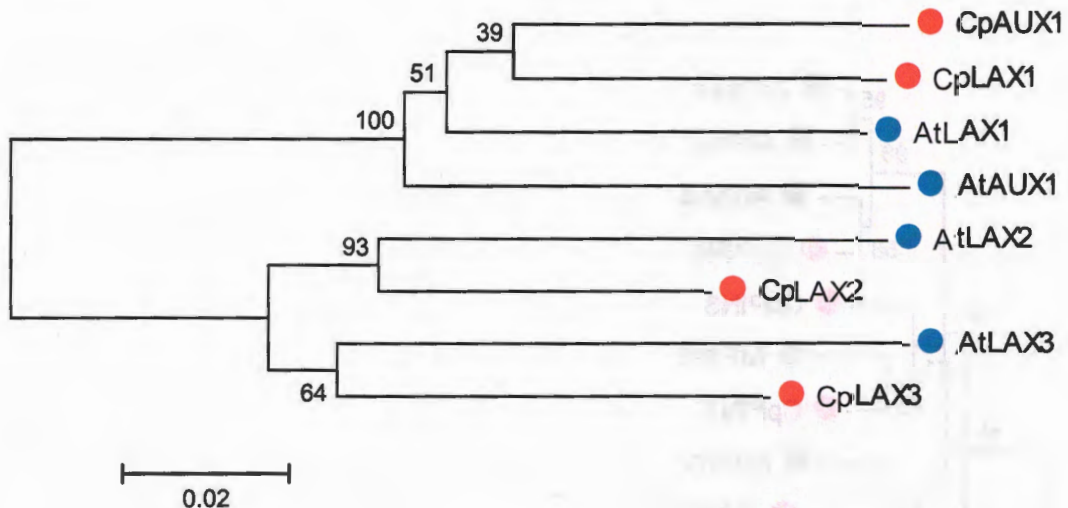


Figura III.4. Árbol filogenético donde se muestra las relaciones existentes entre las 4 secuencias de *Carica papaya* (círculos rojos) y los 4 genes tipo AUX/LAX de *Arabidopsis thaliana* (círculos azules).

Las secuencias tipo *AtPIN* y *CpPIN* indican que la filogenia de la historia evolutiva fue deducida utilizando el método Neighbor-Joining. La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a las particiones indican que en menos del 50% de las réplicas de bootstrap son colapsadas. El porcentaje de réplicas de árboles cuando se asocian con taxones agrupados muestran la réplica de bootstrap de 1000 réplicas al lado de las ramas. El árbol es dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas que se utilizan para deducir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon usando

el modelo basado en la matriz JTT y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La tasa de variación entre los sitios fue modelado con una distribución gamma (parámetro de forma = 0,82). El análisis incluyó a 14 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen gaps y los datos que faltan fueron eliminadas. Hubo un total de 174 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo se llevó a cabo en el programa MEGA5 (Figura III.5.).

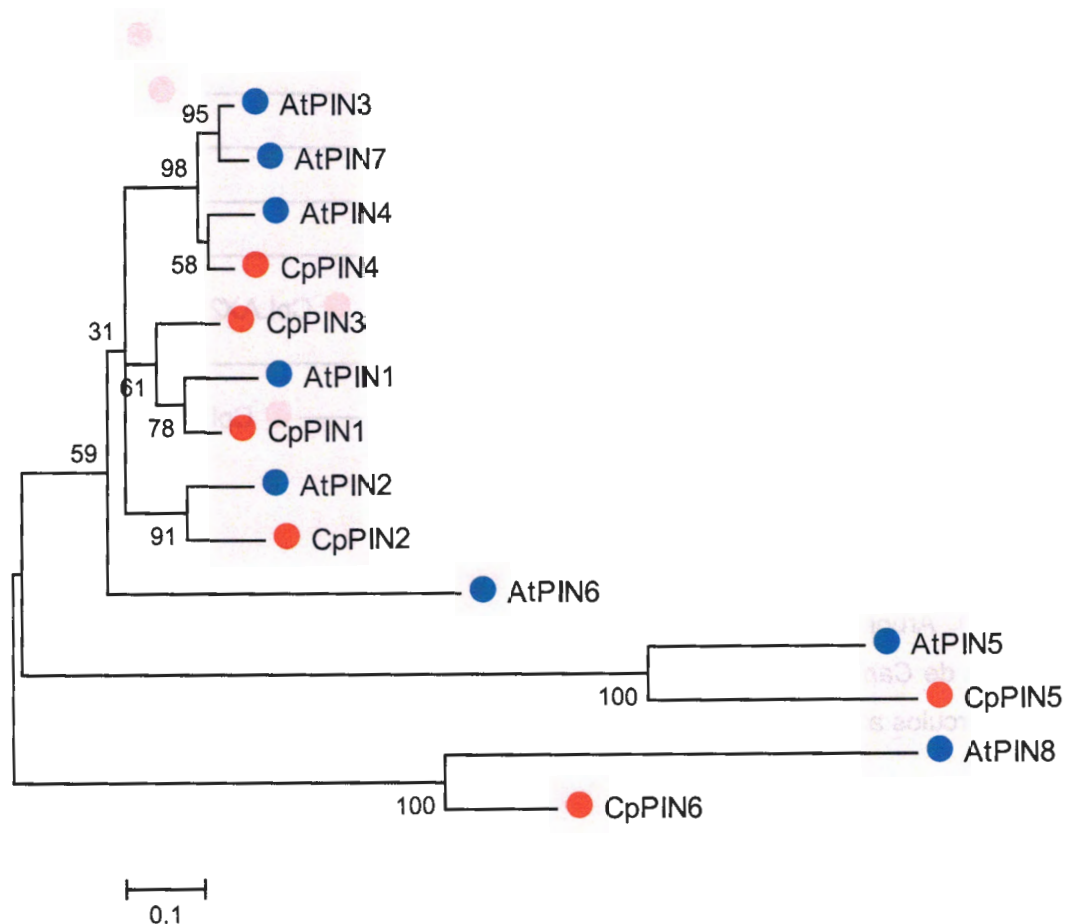


Figura III.5. Árbol filogenético donde se muestra las relaciones existentes entre las 6 secuencias homólogas *CpPIN* *Carica papaya* (círculos rojos) y los 8 genes tipo *AtPIN* de *Arabidopsis thaliana* (círculos azules).

III.5.7. Diseño de oligonucleótidos

Por último se diseñaron los oligos específicos para cada secuencia tipo *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* L. Todos los oligos se diseñaron procurando que tuvieran una longitud de 20-22 bp, con un T_m mayor de 50 °C y una proporción GC del 50%. Se buscó además que el amplicon se encontrará en la zona central de la secuencia predicha.

Cuadro III.5. Diseño de oligonucleótidos de las secuencias de *CpPIN* y *CpAUX/LAX* en *Carica papaya* L.

Secuencias en <i>Carica papaya</i> L.		Secuencias de oligonucleótidos
<i>CpPIN1</i>	F	TGGCTTTGCAACCAAGGATC
	R	AGCCGTTACGTTAGTCGTAAGG
<i>CpPIN2</i>	F	TGTGTAGCCTATGACCTCTTCG
	R	AGGTGTTGGAGCTAACGCATC
<i>CpPIN3</i>	F	TAGCACAGACAGATGGGAAC
	R	ACCGAAGTTTAGAACCGAGG
<i>CpPIN4</i>	F	TCGGCTAGCTGACCAGACCAT
	R	AGCCTTCAGGCTAGAGCATAGG
<i>CpPIN5</i>	F	CTTCAATCATACGGTCAGGCTA
	R	ATCTTCAGGTCCGTACATCGG
<i>CpPIN6</i>	F	TTCGTAGGCTAGGATCCTTGG
	R	AGTCGTACAGTACTTGACCGTG
<i>CpAUX1</i>	F	ACCGAAGTTTAGAACCGAGG
	R	TCGGCTAGCTGACCAGACCAT
<i>CpLAX1</i>	F	CGTAGACGATAGACGATACAGT
	R	TCTGACCTAGTAGCGATCTC
<i>CpLAX2</i>	F	AGCCGTTACGTTAGTCGTAAGG
	R	TGTGTAGCCTATGACCTCTTCG
<i>CpLAX3</i>	F	AGCCTTCAGGCTAGAGCATAGG
	R	CTTCAATCATACGGTCAGGCTA

III.6. DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta por primera vez la identificación y caracterización *in silico* de miembros de la familia AUX/LAX involucrados en el transportadores de entrada de auxinas y miembros PINFORMED (PIN) implicados en el transporte de salida auxinas en el genoma secuenciado de *Carica papaya* var. Sun Up. En *Carica papaya* se identificaron 4 genes AUX/LAX (*CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2*, *CpLAX3*) y 6 genes tipo PIN (*CpPIN1*, *CpPIN2*, *CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5* y *CpPIN6*), ambas familias presentaron homología relativamente alta a la planta modelo de *Arabidopsis thaliana*. También se ha comprobado la presencia de homólogos de genes AUX/LAX y PIN en otras especies de plantas destacando el maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) (McSteen *et al.*, 2007; Morita y Kyojuka, 2007) populus (*Populus trichocarpa*) (Carraro *et al.*, 2012).

En la planta modelo de *Arabidopsis thaliana* se han reportado 4 genes de tipo AUX/LAX que fue la misma cantidad de genes homólogos encontrados en *Carica papaya*, sin embargo, de los 8 genes tipo PIN reportados en *Arabidopsis* sólo se encontraron 6 genes homólogos tipo PIN en *Carica papaya*. Estos resultados parece ser consistente con la reducción en el número de genes del genoma de esta planta (Ming *et al.*, 2008), según los datos reportados por estos autores indican que existe una relación entre el tamaño del proteoma y el número de copias de genes que en nuestro caso sería de tipo PIN presentes en esta especie.

De igual forma se ha reportado que genes homólogos a los PINs de *Arabidopsis* están presentes en los genomas de todo el reino vegetal, para todas las plantas vasculares, y presentan alta identidad de aminoácidos entre las proteínas PIN, lo anterior sugiere que todos los genes PIN divergieron de una secuencia ancestral única (Min *et al.*, 2005). Al menos cuatro estudios filogenéticos de secuencias PIN de diferentes especies de plantas, incluida plantas terrestres, monocotiledóneas y dicotiledóneas reveló que la familia PIN en monocotiledóneas es más amplia y más divergente que en los PIN de las dicotiledóneas (Paponov *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Zazimalova *et al.*, 2007; Krecek *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009), es así como nuestros resultados confirman esta hipótesis, mostrando una disminución de genes PIN en *Carica papaya*, más en general en las dicotiledóneas.

Nuestro aislamiento de genes AUX/LAX en *Carica papaya* (Figura III.2) se observó un perfil de expresión idéntica y altos valores de identidad en genes *CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2* y *CpLAX3* respecto a sus homólogos en *Arabidopsis*, por lo tanto, es probable que sean alelos; además se señaló donde se encuentran las regiones de la hélice transmembranal característico de estas secuencias, sin embargo, aún falta por conocer cuál es el dominio conservado de estas proteínas. Con respecto al alineamiento de genes PINs (Figura III.3) se marca con asteriscos los residuos de Serina/Treonina conservados predichos por el programa NetPhos. En este estudio, para los genes tipo PIN hemos identificado residuos de Ser centralmente ubicados en tres motivos conservados TPRXS (N/S) de proteínas PINs, además de indicar en el alineamiento los motivos TPRXS (N/S) presentes únicamente en el lazo hidrofílico de las proteínas PIN de *Arabidopsis* y de *Carica papaya*, sin embargo, de las seis proteínas homólogas encontradas en *Carica papaya*, los PINs “de distancia corta” (*CpPIN5* y *CpPIN6*) no presentan estos motivos, lo que sugiere que la conservación funcional de los motivos solo se corresponde a los PINs “de distancia larga” en la especie de *Carica papaya*. Además de lo anterior mencionado, los PINs “de distancia corta” claramente carecen de una gran lazo hidrofílico central (Mravec *et al.*, 2009), con lo anterior, nuestra alineación confirma esta observación debido a que los PINs “de distancia corta” de *Carica papaya* (*CpPIN5* y *CpPIN6*) homólogos a los de *Arabidopsis* (*AtPIN5* y *AtPIN8*), indicaron la ausencia del lazo hidrofílico central (Figura III.3), sugiriendo de que no ha habido ninguna ventaja selectiva para mantener el lazo hidrofílico en estos PINs cuya finalidad es determinante para mantener la polaridad.

Nuestro árbol filogenético expone semejanzas sobre la posición de genes tipo AUX/LAX y PINs en *Carica papaya* al establecer comparaciones estructurales con *Arabidopsis*. Los genes tipo AUX/LAX se encuentran en la membrana plasmática, en este sentido *CpAUX* y *CpLAX1* se posicionan en el mismo subclado con sus homólogos *AtAUX1* y *AtLAX1* de *Arabidopsis thaliana*, el gen *AtLAX2* y *CpLAX2* se encuentran estrechamente relacionados entre sí en un subclado, para el caso de *CpLAX3* presenta una alta homología con *AtLAX3* al encontrarse en el mismo subclado del árbol filogenético. Los genes PIN en el árbol filogenético se agrupan de la siguiente manera: *CpPIN4* se agrupa en el mismo clado con sus homólogos *AtPIN3*, *AtPIN7* y *AtPIN4*, de la misma manera *CpPIN1* y *AtPIN1*, *CpPIN2* y *AtPIN2* se agrupan respectivamente en sus mismos subclados. El árbol filogenético mostró que *CpPIN5* presenta una alta homología con

AtPIN5 de *Arabidopsis thaliana*, también se identificó el homólogo de *AtPIN8* nombrado como *CpPIN6*, estos genes identificados como transportadores “cortos”; los anteriores presentan un perfil hidrofóbico conservado con los de sus homólogos en *Arabidopsis* localizados en el retículo endoplasmático, sin embargo, esta localización subcelular representa una divergencia con los otros PINs “de distancia larga”, esta peculiaridad sugiere una implicación importante desde el punto de vista evolutivo según lo señalado por Wabnik *et al.*, (2011).

En relación a los análisis *in silico*, las regiones de la hélice transmembranal en la estructura primaria de las proteínas AUX/LAX, las regiones de la hélice transmembranal en la estructura primaria, el dominio hidrofóbico, el lazo hidrofílico y los dominios conservados TPRXS de las proteínas PINs, así como al porcentaje de identidad y la relación filogenética existente entre las secuencias tipo AUX/LAX y PIN de *Carica papaya* y las de *Arabidopsis*, podemos concluir que las ambas familias con sus respectivas secuencias conforman dos pequeñas familias génicas dentro del genoma secuenciado de la papaya transgénica Sun Up. El aislamiento *in silico* de las secuencias *CpAUX/LAX* y *CpPIN* de *Carica papaya* nos sirvió de punto de partida para el cuarto capítulo de investigación de esta tesis, en base a las secuencias predichas y realizando el diseño correspondiente de los oligos para estos transportadores de auxina se evaluó la expresión basal de estas secuencias en diferentes tejidos (raíz, base de tallo y hoja) de una planta de papaya var. Maradol y de igual manera la expresión génica en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* establecidas en el capítulo II.

III.7. CONCLUSIONES

- Se reporta por primera vez, la identificación *in silico* de la familia completa de genes tipo *CpAUX/LAX* (4), así como la familia completa de genes tipo *CpPIN* (6) en el genoma secuenciado de *Carica papaya* var. Sun Up. en comparación con lo reportado en *Arabidopsis thaliana* el cual reporta 8 secuencias tipo PIN y 4 secuencias tipo AUX/LAX.
- Las secuencias en *Carica papaya* L. homólogas a los genes AUX/LAX se denominaron: *CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2* y *CpLAX3* y para el caso de genes PIN se nombraron: *CpPIN1*, *CpPIN2*, *CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5* y *CpPIN6*.
- El árbol filogenético mostró que estos genes se agrupan en el mismo clado en comparación con lo reportado en *Arabidopsis thaliana*.
- El árbol filogenético demuestra que las secuencias *CpPIN5* y *CpPIN6* se encuentran distanciados en comparación con los otros genes; debido a que según la literatura estos genes en *Arabidopsis thaliana* son PINs de distancia corta con localización en el retículo endoplasmático por esta razón son considerados como transportadores secundarios.
- El alineamiento diseñado entre las proteínas AUX1/LAX de *Arabidopsis thaliana* comparada con los de *Carica papaya* demostró rangos de 400 a 500 aminoácidos, con regiones centrales altamente conservadas, con hélices trans-membranales. Las proteínas *CpLAX* en *Carica papaya* mostraron N-terminal ricos en aminoácidos acídicos y C-terminal ricos en prolina característicos de esta familia.
- El alineamiento diseñado entre las proteínas *CpPIN* de *Carica papaya* demostró lazos hidrofílicos, tres motivos evolutivamente conservados TPRXS (N/S) dentro del lazo hidrofílico y residuos centrales de Ser en la proteína quinasa Ser/Thr PINOID (PID) característicos de esta familia.

- Se diseñaron los oligonucleótidos para las secuencias *CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2*, *CpLAX3* y *CpPIN1*, *CpPIN2*, *CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5* y *CpPIN6* en *Carica papaya* L.

III.8. REFERENCIAS

- Bainbridge K., Guyomarch S., Bayer E., *et al.* (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes and Development* **22**: 810-823.
- Benjamins R., Quint A., Weijers D., Hooykaas P. and Offringa R. (2001) The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* **128**: 4057-4067.
- Berkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. and Friml J. (2003) Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**:591-602.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., *et al.* (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950.
- Bennett S.R.M., Alvarez J., Bossinger G. and Smyth D.R. (1995) Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **8**: 505-520.
- Bohn-Courseau I. (2010) Auxin: a major regulator of organogenesis. *Jornal C.R. Biol* **333**: 290-296.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. and Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T. and Masson P.H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 15112-15117.
- Christensen S.K., Dagenais N., Chory J. and Weigel D. (2000) Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**: 469-478.

- Carraro N., Tisdale-Orr T.E., Clouse R.M., Knöller A.S. and Spicer R. (2012) Diversification and expression of the PIN, AUX/LAX, and ABCB families of putative auxin transporters in *Populus*. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1-37.
- Carrier D.J., Norliza T.A.B., Lawler K., Dorrian J.M., Haider A., Bennett M.J. and Kerr I.D. (2009) Heterologous Expression of a Membrane-Spanning Auxin Importer: Implications for Functional Analyses of Auxin Transporters. *International Journal of Plant Genomics* **1**: 1-8.
- De Smet I. and Jurgens G. (2007) Patterning the axis in plants - auxin in control. *Current Opinion in Genetics and Development* **17**:337-43.
- De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., Frey N.F., Laplace L., Casimiro I., Swarup R., Naudts M., Vanneste S., Audenaert D., Inzé D., Bennett M.J., Beeckman T. (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**:681-690.
- Ding Z., Galván-Ampudia C.S., Demarsy E., Langowski L., Kleine-Vehn J., Fan Y., Morita M.T., Tasaka M., Fankhauser C., Offringa R., *et al.* (2011) Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* **13**: 447-452.
- Dubrovsky J.G., Gambetta G.A., Hernandez-Barrera A., Shishkova S., Gonzalez I. (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* **97**: 903-915.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. and Jurgens G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**:147-153.
- Friml J., Wisniewska J., Benkova E., Mendgen K. and Palme K. (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809.

- Friml J. *et al.* (2004) A PINOID-dependent binary switch in apicalbasal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**: 862–865.
- Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. and Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230.
- Geisler M. and Murphy A.S. (2006) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* **580**: 1094-1102.
- GeneProject - Bioinformatics Software - Altvista. Bioinformatics Software for data analysis, manipulation and view. Blast Parser, PolnTree, PSI Protein Classifier. Disponible en: <http://geneproject.altvista.org/>.
- Hall Thomas A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98.
- Heisler M.G., Ohno C., Das P., Sieber P., Reddy G.V., Long J.A., Meyerowitz E.M. (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology Journal* **15**: 1899-1911.
- Huang Fang, Marcelo Kemel Zago, Lindy Abas, Arnoud van Marion, Carlos Samuel Galván-Ampudia and Remko Offringa (2010). Phosphorylation of Conserved PIN Motifs Directs Arabidopsis PIN1 Polarity and Auxin Transport. *The Plant Cell* **22**: 1129–1142.
- Jonsson H., Heisler M.G., Shapiro B.E., Mjolsness E., Meyerowitz E.M. (2006) An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 1633-1638.

- Kemel Z. and Offringa R. (2006) Components and targets of the PINOID signaling complex in *Arabidopsis thaliana*. Chapter 4: PID phosphorylates PIN cytoplasmic loops at conserved residues. University of Tübingen. Germany. pp. 81-100.
- Keuskamp D.H., Pollmann S., Voesenek L.A.C.J., Peeters A.J.M., Pierik R. (2010). Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**: 22740-22744.
- Kramer E.M. (2004) PIN and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends in Plant Science* **9**: 578-582.
- Kramer E.M. (2009) Auxin-regulated cell polarity: an inside job? *Trends in Plant Science* **14**: 242-247.
- Kramer E.M. and Bennett M.J. (2006) Auxin transport: a field in flux. *Trends in Plant Science* **11**: 382-386.
- Kramer E.M., Rutschow H.L. and Mabie S.S. (2011) AuxV: a database of auxin transport velocities. *Trends in Plant Science* **16**: 461-463.
- Krecek P., Skupa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J. and Zažímalová E. (2009) Protein family review. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* **10**:1-11.
- Laskowski M., Grieneisen V.A., Hofhuis H., *et al.* (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology* **6**: 307.
- Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P., Fink G.R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropismo in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development* **12**:2175-2187.

- Marchant A. and Bennett M.J. (1998) The *Arabidopsis* AUX1 gene: a model system to study mRNA processing in plants. *Plant Molecular Biology* **36**: 463-471.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P.J., Bennett M., Sandberg G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **14**: 589-597.
- Marchant A., Kargul J., May S. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal* **15**: 2066-2073.
- McSteen P., Malcomber S., Skirpan A., Lunde C., Wu X., Kellogg E., Hake S. (2007) Barren inflorescence2 encodes a co-ortholog of the PINOID serine/threonine kinase and is required for organogenesis during inflorescence and vegetative development in *maize*. *Plant Physiology* **144**: 1000-1011.
- Michniewicz M., Zago M.K., Abas L., Weijers D., Schweighofer A., Meskiene I., Heisler M.G., Ohno C., Zhang J., Huang F., Schwab R., Weigel D., Meyerowitz E.M., Luschnig C., Offringa R., Friml J. (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**: 1044-1056.
- Ming R., *et al.* (2008b) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* **452**:991-997.
- Mishra M., Shukla N. and Chandra R. (2007) Micropropagation of papaya (*Carica papaya* L.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* **2**:437-441.
- Morita Y. and Kyoizuka J. (2007) Characterization of OsPID, the rice ortholog of PINOID, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant Cell Physiology* **48**: 540-549.
- Mravec J., *et al.* (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**: 1136-1140.

- Müller A., Guan C., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E. and Palme K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal* **17**: 6903-6911.
- Paponov I.A., Teale W.D., Trebar M., Bliou I. and Palme K. (2005) The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* **10**: 170-177.
- Parry G., Marchant A., May S. (2001) Quick on the uptake: characterization of a family of plant auxin influx carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**: 217-225.
- Petrásek J. and Friml J. (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675-2688.
- Phytozome. Department of Energy's Joint Genome Institute and the Center for Integrative Genomics. Disponible en: <http://www.phytozome.net>
- Rakusová H., Gallego-Bartolomé J., Vanstraelen M., Robert H.S., Alabadí D., Blázquez M.A., Benková E., Friml J. (2011) Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **67**: 817-826.
- Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., *et al.* (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255-260.
- SOFTBERRY bioinformatics suite. Disponible en: <http://linux1.softberry.com/all.htm>
- Swarup K., Benková E., Swarup R., *et al.* (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**: 946-954.
- Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K. and Bennett M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct

- hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Development Journal* **15**: 2648-2653.
- Swarup R., Kargul J., Marchant A. (2004) Structure–function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *The Plant Cell* **16**: 3069-3083.
- Swarup R., Kramer E.M., Perry P., *et al.* (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology* **7**: 1057–1065.
- Tomas A. and Perrot-Rechenmann C. (2010) Recent progress in auxin biology. *C. R. Biol.* **333**: 297-306.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benkova E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C. and Friml J. (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent crossregulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521-4531.
- Wabnik K., Kleine-Vehn J.R., Govaerts W., Friml J.A. (2011) Prototype cell to cell auxin transport mechanism by intracellular auxin compartmentalization. *Trends in Plant Science* **16**: 468–475.
- Wang Q., Kong L., Hao H., Wang X., Lin J., Samaj J., Baluska F. (2005) Effects of brefeldin A on pollen germination and tube growth: antagonistic effects on endocytosis and secretion. *Plant Physiology* **139**: 1692-1703.
- Xu J., Scheres B. (2005) Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 functions in epidermal cell polarity. *Plant Cell* **17**: 525–536
- Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E. (2006) High-affinity auxin transport by the aux1 influx carrier protein. *Current Biology Journal* **16**: 1123-1127.

Zazimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K. and Hosek P. (2010) Auxin transporters—why so many? *Cold Spring Harb. Perspect Biology* **2**: 1-14.

Zhang J., Nodzynski T., Pencik A., Rolcik J., Friml J. (2010) PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**: 918-922

Zhang Z., *et al.* (2000) Greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**: 203-214.

Zhang J., Nodzynski T., Pencik A., Rolcik J. and Friml J. (2010) PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**: 918-922.

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES TRANSPORTADORES DE AUXINAS EN PLÁNTULAS DE *Carica papaya* L. var. Maradol EXPUESTAS A IBA BAJO DIFERENTES SISTEMAS DE ENRAIZAMIENTO *in vitro*.

IV.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas tienen una capacidad impresionante para desarrollar un sistema radicular que le permite maximizar su supervivencia en ambientes hostiles (Negi *et al.*, 2008). Las raíces primarias se forman en el embrión y emergen de la semilla durante la germinación, estas raíces recién emergidas son sensibles a condiciones ambientales, tales como la gravedad, que actúa como una señal para el crecimiento de las raíces en zonas donde existe disponibilidad de humedad y nutrientes (Muday y Rahman, 2007). En última instancia, la raíz lateral se alarga y se somete a más reiterativas ramificaciones, esta arquitectura radicular permite la absorción de nutrientes y crea una red de apoyo subterráneo que es esencial para el anclaje de la planta (Negi *et al.*, 2008).

Las sustancias de señalización de las plantas, también conocidas como fitohormonas, como son la auxina, etileno, citocinas, ácido jasmónico, ABA o giberelinas, son moduladores centrales para el crecimiento de las plantas y su desarrollo. Recientemente, estudios de genética molecular han descifrado componentes claves para la percepción y transducción de señales de estas fitohormonas (Davies, 2004). Algunas de las interacciones sinérgicas entre la auxina y el etileno han sido muy bien definidas en la regulación de la elongación del hipocotíleo, crecimiento del pelos radicales, la diferenciación de meristemas radicales, la formación de gancho apical, el gravitropismo de la raíz y el crecimiento de las raíces, lo que sugiere que estas dos vías de señalización también interactúan a nivel molecular (Ruzicka *et al.*, 2007).

Es así como las auxinas han estado estrechamente vinculadas al crecimiento y desarrollo de raíces principales y laterales (Casimiro *et al.*, 2003; Teale *et al.*, 2005; Malamy, 2008). La elevada concentración de auxina, que se logra mediante la aplicación de auxina

exógena o por su síntesis, aumentan la ramificación de la raíz (Torrey, 1976; Sitbon *et al.*, 1992; Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995). El transporte polar de la auxina se produce a través del movimiento de célula a célula (Leyser, 2006). En las raíces, el AIA se mueve acropetalamente (desde zonas apicales hacia el ápice de la raíz) y se mueve basipetalamente (desde el ápice radicular hacia zonas apicales) mediante capas externas de la raíz (Muday y DeLong, 2001), en este sentido, el transporte de auxina se lleva a cabo por el influjo y eflujo de proteínas transportadoras de auxinas (Muday y DeLong, 2001). Un número de transportadores de entrada de la auxina, por ejemplo, los genes de la familia AUX/LAX (AUX1-like), y transportadores de salida, por ejemplo, los de la familia PIN-FORMED (PIN), se han aislado y caracterizado en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Bennett *et al.*, 1996; Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002b; Friml *et al.*, 2002c).

Estos transportadores se identificaron a través de fenotipos mutantes que estaban vinculados con los procesos de transporte de auxinas, como gravitropismo y la arquitectura de la raíz (Okada *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1998; Noh *et al.*, 2001; Blakeslee *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007). Se ha demostrado que estos transportadores modulan los movimientos de AIA (Geisler *et al.*, 2005; Terasaka *et al.*, 2005; Petrasek *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Blakeslee *et al.*, 2007). En particular, la mutante *mdr1/pgp19* tiene reducido el transporte acropetalo de IAA, además en plantas *wild-type* se ha observado una notable reducción en el número de las raíces laterales (Wu *et al.*, 2007). De la misma manera, en plantas de *Arabidopsis thaliana* se ha observado que *aux1* tiene reducido el transporte basipetalo y acropetalo de IAA (Rashotte *et al.*, 2001; Rashotte *et al.*, 2003), y ha presentado reducciones significativas en la formación de raíces laterales (Marchant *et al.*, 2002).

Recientemente, los mecanismos moleculares que subyacen a la percepción de la auxina y la transducción de la señal también se han elucidado. La señalización de la auxina está mediado principalmente por tres familias de proteínas: FACTOR DE RESPUESTA A AUXINA (ARF) familia de factores de transcripción que son responsables de la regulación de la expresión génica de la auxina-inducible (AUX/IAA), estos son inhibidores transcripcionales que interactúan con ARFs y evita su acción, las proteínas F-box, que son parte de la proteína ubiquitina ligasa SCF^{TIR1} controlan la rápida degradación mediada

por ubiquitina de la AUX/IAA en respuesta a la auxina. TIR1 y proteínas relacionadas F-box actúan como receptores de auxinas, la unión de la auxina aumenta en gran medida su interacción con AUX/IAA y en última instancia conduce a la degradación de AUX/IAA de la serotonina (Muday *et al.*, 2006).

El interés final de este trabajo radica en comprender algunos de los mecanismos moleculares mediante la expresión de genes transportadores de auxinas de tipo AUX/LAX y PIN por medio del cual se produce o no el enraizamiento en diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* en plántulas de *Carica papaya*.

IV. 2. HIPÓTESIS

Los genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN de *Arabidopsis thaliana* presentan patrones de expresión en las zonas meristemáticas de la raíz; por lo tanto, es probable que genes homólogos AUX/LAX y PIN en *Carica papaya* L. también presenten esta expresión basal en las zonas radicales de vitroplantas de papaya var. Maradol expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*. De igual forma es posible que los patrones de expresión de estos genes puedan cambiar en respuesta a IBA exógena.

IV.3. OBJETIVOS

IV.3.1. Objetivo general

- Evaluar los patrones de expresión de genes transportadores de auxinas en plántulas *in vitro* de *Carica papaya* L. var Maradol en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* propuestos.

IV.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la expresión basal de genes transportadores de auxinas en raíz, base de tallo y hojas en plantas *in vitro* de *Carica papaya* L. var. Maradol.
- Evaluar la expresión de genes transportadores de auxinas en raíz, base de tallo y hojas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* con y sin la adición de IBA en plántulas de *Carica papaya* L. var. Maradol.

IV.4. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.4.1. Material Vegetal

Para este capítulo se usaron las vitroplantas obtenidas de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) expuestos en el Capítulo II (Caracterización morfológica en diferentes sistemas *in vitro* desarrollados para inducir la formación de raíces adventicias en plántulas de *Carica papaya* L.), de igual manera para nuestros tratamientos Controles se utilizó vitroplantas provenientes de semilla cultivadas bajo condiciones *in vitro*. Para realizar la expresión basal se utilizó plantas de 2 meses provenientes de semillas de papaya var. Maradol sembradas en charolas de plástico. Para todos los tratamientos se utilizó raíz, base de tallo y hojas.

IV.4.2. Extracción de RNA

Se realizaron las extracciones de RNA total, según el protocolo establecido por el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular de la Unidad de Biotecnología. Se usó para la extracción de RNA 500 mg de peso fresco de raíces así como para la base de tallo, mientras que solo se necesitó 100 mg de peso fresco de hoja para las vitroplantas de papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol. El material vegetal se mantuvo en ultracongelador hasta su procesamiento.

IV.4.3. Síntesis de cDNA

En tubos Eppendorf de 20 μ L se agregó el volumen necesario de RNA para obtener una concentración de 500 ng de RNA en 9 μ L de la muestra. Se adicionó Random Primers a una concentración 1 μ g/L, posteriormente se incubó a 70°C durante 5 min e inmediatamente las muestras fueron expuestas en hielo durante 5 min. Se añadió 9 μ L de la mezcla de reacción compuesta por 4.0 μ L de Buffer 5x First standard, 2.0 μ L DTT (0.1 M), 1.0 μ L $MgCl_2$ (25 mM), 1.0 μ L dNTPs (10 mM), 1.0 μ L Transcriptasa reversa (Invitrogen), los tubos fueron expuestos agitados suavemente y expuestos a centrifugación durante 10 segundos. Las muestras fueron incubadas a 25°C durante 5

min, 42°C durante 90 min y finalmente 70°C durante 15 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta realizar la extensión con los oligonucleótidos adecuados.

IV.4.4. Análisis de RT-PCR

La extensión de los genes de auxinas se efectuó a partir de 1.5 a 2 µL de template en mezcla con 5 µL de Buffer 10x PCR, 2.0 µL MgCl₂, 0.8 µL de dNTPs, 1 µL de primer Sentido, 1 µL de primer Antisentido, 0.2 µL de TaqPolimerasa (Invitrogen), y agua suficiente para aforar a un volumen de 50 µL. Los parámetros de PCR son las siguientes: 95°C durante 3 min para la desnaturalización inicial, seguido de 38 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 30 seg, la alineación a 55.6°C durante 1 minuto, la extensión a 72°C durante 2 minutos, y la etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. Se eluyen los fragmentos en gel de agarosa al 1.5% a 75 V durante 55 min.

IV.4.5. Electroforesis de RNA

Preparación del gel: se pesó 1.35 g de agarosa (1.5%) y se introdujo en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se añadió 90 mL del buffer de electroforesis (TAE), seguidamente, la agarosa con el TAE fue expuesto a calor para la disolución de este gelificante, posteriormente fue vertido la agarosa en la bandeja de la cámara de electroforesis y se le agregó 2 µL de bromuro de etidio. Se dejó solidificar la agarosa con los peines respectivos y finalmente se añadió el buffer de electroforesis hasta el borde del gel.

IV.5. RESULTADOS

IV.5.1. Análisis de la expresión basal en *Carica papaya* var. Maradol

Se realizaron las extracciones de RNA en plantas de semillas de 2 meses de edad y con una altura promedio de 10-15 cm, que fueron germinadas con anterioridad en charolas de plástico. Las extracciones se llevaron a cabo como lo describe el protocolo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, en el Cuadro IV.1, indica las cantidades de las muestras utilizadas, en el caso de raíz y base de tallo se ajustó el protocolo utilizando cantidades mayores a 500 mg para las raíces y para base-tallo, en cuanto a las hojas se adecuó utilizar de 200 a 300 mg de muestra.

Cuadro IV.1. Resultados de cantidad de muestra, lecturas realizadas y rendimiento obtenidos en diferentes muestras de plantas de semilla *ex vitro* de *Carica papaya* L. var. Maradol.

Planta de semilla de papaya Maradol	Cantidad de muestra	(A260)/(A280)	[RNA] ng/ μ L	Rendimiento [RNA] μ g/100 mg de PF
Raíz	0.6985	2.173	924.4	3.97
Base de Tallo	0.4005	2,117	172.4	1.29
Hoja	0.2924	2,083	2173.2	22.29

Se presenta la relación A260/A280 como indicador de pureza. La concentración en μ g de RNA por mg de tejido fresco como indicador de rendimiento.

El rendimiento de RNA indica que existen diferencias entre los tejidos en plantas de semilla de *Carica papaya* var. Maradol; en el caso de raíz utilizando cantidades arriba de 500 mg, se obtiene 924.4 ng/ μ L que equivale a 3.97 μ g RNA/100 mg PF en plantas de semilla. El rendimiento de RNA en la base del tallo es de 1.29 μ g RNA/100 mg PF y en las hojas se observa el rendimiento de RNA muy superiores a todos los demás tejidos (22.29 μ g RNA/100 mg PF).

Se uso como marcador constitutivo el gen *EF1 α* (PM: 200 pb) para todos los tejidos de *Carica papaya* L. En la Figura IV.1 se muestra de izquierda a derecha tres diferentes tratamientos (vitroplantas, plantas de semilla *in vitro* y plantas de semilla *ex vitro*) con sus respectivos tejidos (raíz: R, base de tallo: BT y hoja: H). Con el uso de este *house keeping* se ha observado expresión homogénea en todos los tejidos, además de presentar la misma intensidad de banda (expresión) en todos los tejidos analizados, debido a lo anterior se decidió utilizar este gen marcador.

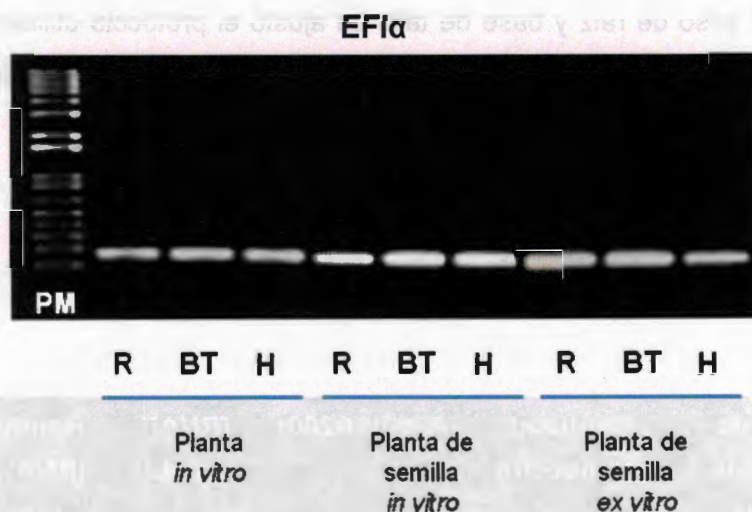


Figura IV.1. Expresión del gen marcador utilizado como control (*Housekeeping*: 200 pb) en diferentes tejidos (R: raíz, BT: base de tallo y H: hoja) en plántulas de *Carica papaya* L. var Maradol. Provenientes de tres orígenes diferentes: Plántula *in vitro*. Plántula de semilla *in vitro* y Plántula de semilla *ex vitro*. PM indica el marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Gel al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

En cuanto a la expresión basal de los genes en plantas jóvenes provenientes de semilla, como se observa en la Figura IV.2, los transcritos de los genes *CpPIN1* muestran una baja expresión solo en raíz, mientras que los genes *CpPIN2* y *CpPIN3* no se expresan en hojas pero sí en raíz y base de tallo; para los genes *CpPIN4* y *CpPIN5* están presentes en todos los tejidos, sin embargo, en el gen *CpPIN5* se observa una alta expresión en comparación con los demás transportadores de salida. Para el caso de los transportadores de entrada en *Carica papaya* L. los genes *CpAUX1* y *CpLAX3*

presentaron alta expresión en todos los tejidos, mientras que para el gen *CpLAX2* presentó baja expresión en la raíz, pero una alta expresión en la base del tallo y en hojas.

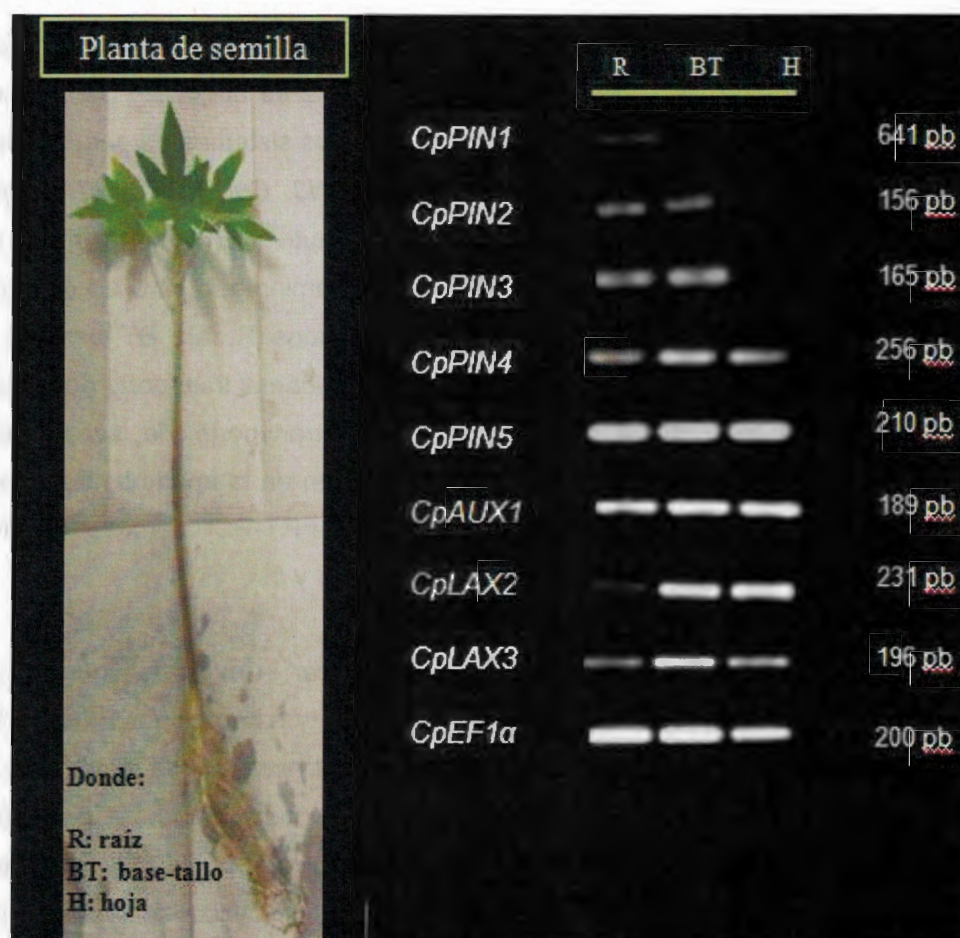


Figura IV.2. Expresión basal de genes transportadores de auxinas *CpAUX/LAX* y *CpPIN* . en tres tejidos de plantas de *Carica papaya* L. var. Maradol. Expresión de los genes *CpAUX1*, *CpLAX2* y *CpLAX3* y de *CpPIN1* al *CpPIN5*. Gen marcador *CpEF1α* (*Housekeeping*). Entre paréntesis se indica el tamaño de amplicon en pb de cada gen. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

IV.5.2. Análisis de la expresión de genes AUX/LAX y PIN en *Carica papaya* var. Maradol en diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*.

En base a la expresión basal realizada a plantas de papaya de semilla var. Maradol, se estableció que sólo los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2* se utilizarían para evaluar la expresión génica de estos transportadores en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, lo anterior debido a que los demás genes (*CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5*, *CpPIN6*, *CpAUX1*, *CpLAX1* y *CpLAX3*) mostraban expresión constitutiva. En este trabajo se evaluó la expresión específica en diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* en plántulas de *Carica papaya*, esta evaluación se realizó en diferentes tejidos (R: raíz, BT: base de tallo y H: Hoja). Se evaluaron la expresión de un gen relacionado con el transporte de entrada de auxinas (*CpLAX2*) y dos genes involucrados en el transporte de salida de esta fitohormona (*CpPIN1*, *CpPIN2*) para analizar la modulación en la aparición de las raíces, así mismo, todas las expresiones génicas se analizaron por RT-PCR semi-cuantitativo, los resultados se presentan en las siguientes Figuras IV.3, 4 y 5.

Los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2* utilizados para ver la expresión génica son de importancia debido a que existen reportes que indican que sus homólogos PIN1 y PIN2 en plantas de *Arabidopsis thaliana* modulan el intercambio intracelular y la localización polar de la auxina en la membrana plasmática, además de contribuir a modular los gradientes locales de auxina para el desarrollo de la planta (Zazimalová *et al.*, 2010). Por otra parte se ha definido que estos dos genes (PIN1 y PIN2) en *Arabidopsis thaliana* se expresan desde la punta de la raíz hacia la zona de elongación de células epidérmicas, según lo reportados por Blilou *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007 estos genes son los principales intermediarios transportitas que participan en el desarrollo de las raíces.

A continuación se presentan los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* en plántulas de papaya var. Maradol establecidas en el Capítulo II, estas plántulas fueron las utilizadas para analizar mediante RT-PCR semi-cuantitativo la expresión génica de los transportadores de auxinas anteriormente mencionados.

En la siguiente Figura IV.3 se ilustra los resultados del análisis RT-PCR semi-cuantitativo en tejidos de raíces de vitroplantas Control (plantas semillas de papaya var. Maradol

germinadas *in vitro*) y de vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, todas las plántulas sin la adición de auxinas y la otra mitad con 2 mg L⁻¹ de IBA exógeno. Cabe destacar que en las plantas Control sin IBA los transcriptos *CpPIN1* mostraron expresión intermedia en la raíz y de manera más tenue sin IBA. Por otra parte, el gen *CpPIN2* presentó expresión baja sin IBA y alta expresión cuando se adiciona este fitorregulador. El gen *CpLAX2* se expresa en la raíz pero con baja expresión. De manera similar, con 2 mg L⁻¹ de IBA en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* el gen *CpPIN1* consistentemente se observa que se expresa muy tenue en los sistemas LQ y LQ+P. El gen *CpPIN2* se expresa en todos los sistemas de enraizamiento *in vitro*, pero con expresión más alta en el sistema LQ. Para el gen transportador de entrada *CpLAX2* se expresó en las raíces de todas las plantas, sin embargo, en el sistema LQ+P se observó mayor expresión. El *housekeeping* *EF1α* fue nuestro control positivo expresandose en todos los tejidos.

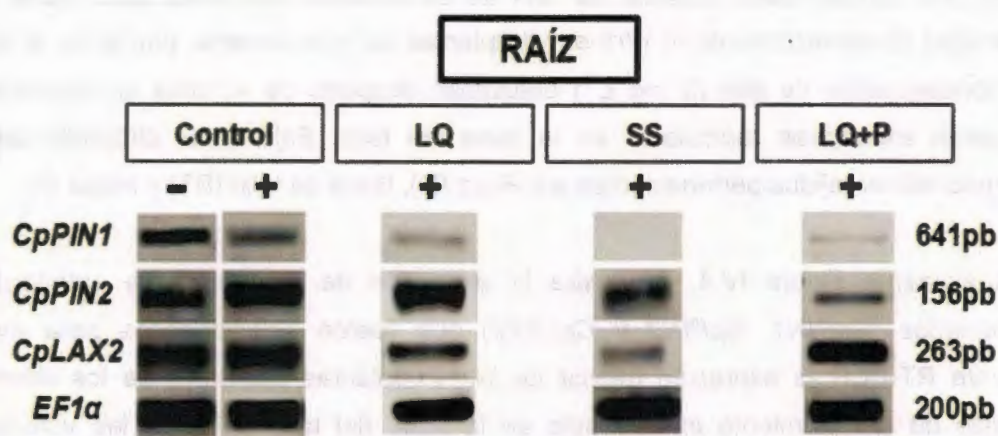


Figura IV.3. Análisis de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativa de genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN en vitroplantas Control y vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) en tejidos de raíz en vitroplantas de *Carica papaya* sin (-) y con 2 mg L⁻¹ de IBA exógena (+). pb: tamaño de amplicón.

Las vitroplantas que fueron evaluadas en el tratamiento de la Figura IV.3, 4 y 5 permanecieron con anterioridad durante 42 días en una etapa de desintoxicación para descartar concentraciones endógenas de auxinas o citocininas que pudieran afectar nuestro análisis. Cabe destacar que estas vitroplantas son provenientes de organogénesis directa, por tal motivo, al no adicionarle en su medio de cultivo concentraciones de IBA, las vitroplantas no produjeron raíces, con lo anterior, en vitroplantas a las cuales no se les adicionó IBA en sus respectivos medios de cultivo no generaron raíces, fue por eso que en la Figura IV.3, sólo se mostreó tejidos de la base de tallo (BT) y hojas (H).

Las vitroplantas evaluadas de la Figura IV.3, 4 y 5 permanecieron durante 42 días en una etapa conocida como enraizamiento *in vitro*, esta etapa consistió en exponer las vitroplantas en diferentes sistemas de enraizamiento (LQ, SS y LQ+P) para inducir la formación de raíces además de adicionar en sus respectivos medios de cultivo 2 mg L^{-1} de IBA. La concentración anterior de IBA se ha utilizado con éxito para lograr altos porcentajes de enraizamiento *in vitro* en vitroplantas de esta especie, por tanto, al utilizar esta concentración de IBA (2 mg L^{-1}) obtuvimos después de 42 días vitroplantas que produjeron estructuras radiculares en la base del tallo. Bajo estas circunstancias se consiguió utilizar tejidos pertenecientes a la Raíz (R), Base de tallo (BT) y Hojas (H).

En la siguiente Figura IV.4, se ilustra la expresión de los genes ya anteriormente mencionados (*CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2*) que fueron seleccionados para evaluar mediante RT-PCR la expresión génica de las vitroplantas Control y de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* sólo en la base del tallo (BT). En las vitroplantas Control, el gen *CpPIN1* se expresó de manera significativa en la base del tallo cuando estas no tenían IBA y con expresión más tenue cuando estas vitroplantas contenían IBA exógena. En los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, en los sistemas semisólido (SS) y líquido (LQ) mostraron una tendencia similar, en estos dos sistemas el gen *CpPIN1* se expresó con mayor intensidad en la base del tallo cuando las vitroplantas contenían IBA mientras sin IBA exógenas, estas vitroplantas no mostraron expresión en la base del tallo. Con respecto al sistema líquido (LQ+P) el gen *CpPIN1* no se expresó en BT aún cuando se adicionó IBA exógeno. En la BT de todas las vitroplantas el gen *CpPIN2* se expresó cuando estas contenían IBA exógeno, por lo contrario cuando no contenían este fitorregulador el gen *CpPIN2* no se expresó. Con respecto al gen *CpLAX2*, se observa que

en vitroplantas Control se expresa de manera constitutiva en BT sin y con la adición de IBA exógena, además, en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* el gen *CpLAX2* se expresó de manera tenue cuando no se adiciona IBA, por lo contrario, cuando este fitorregulador esta presente se expresa muy fuerte en los sistemas LQ y LQ+P correspondiente en a la BT; de igual forma este gen se expresa con menor intensidad en el sistema SS. El *housekeeping* utilizado como control positivo en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* se expresó de manera satisfactoria en la BT de todas las vitroplantas.

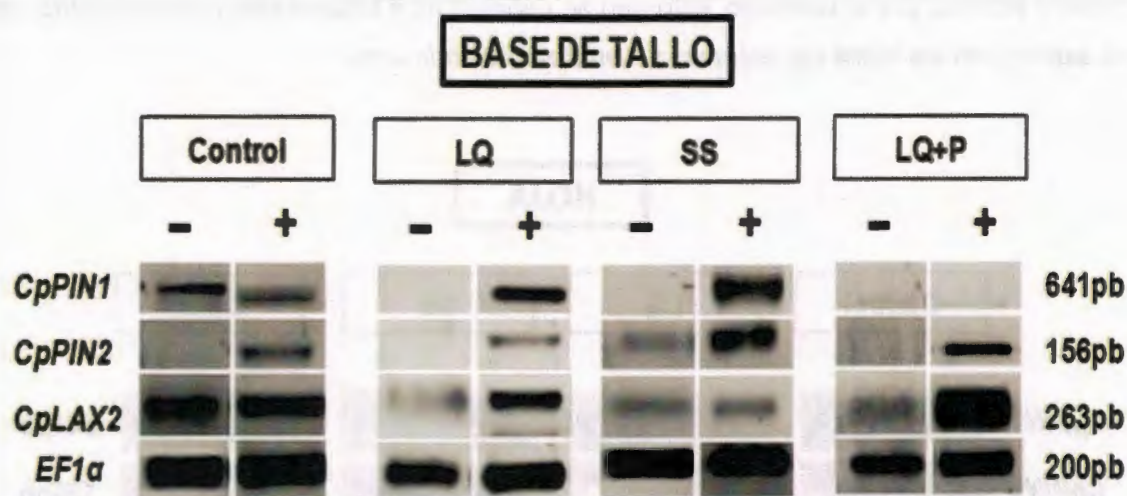


Figura IV.4. Análisis de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativos de genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN en vitroplantas Control y vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) en tejidos de la base del tallo (BT) de *Carica papaya* sin (-) y con 2 mg L⁻¹ de IBA exógena (+). pb: tamaño de amplicón.

En la siguiente Figura IV. 5 se ilustra la expresión de genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2* de *Carica papaya* para evaluar mediante RT-PCR la expresión génica de los genes anteriormente mencionados en vitroplantas Control y en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* en tejidos de hojas sin y con 2 mg L⁻¹ de IBA exógena. En vitroplantas Control el gen *CpPIN1* se expresó en vitroplantas con IBA y de manera tenue

sin este fitorregulador. En los sistemas de enraizamiento *in vitro* SS y LQ+P se observó que el gen *CpPIN1* presenta una baja expresión en las hojas sin y con IBA, sin embargo, en el sistema LQ con la adición de IBA exógeno se observó mayor expresión del gen *CpPIN1* en la hoja, aún más alta que en las vitroplantas Control. Consistentemente el gen *CpPIN2* no se expresó en tejidos de hojas en vitroplantas Control y de los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*, únicamente el gen *CpPIN2* se expresó de manera intermedia en el sistema LQ+P cuando estas vitroplantas contenían IBA. Al analizar el gen *CpLAX2* en las vitroplantas Control y de los diferentes sistemas de enraizamiento, se observó que únicamente en vitroplantas Control sin IBA el gen *CpLAX2* se expresó de manera intensa, por lo contrario, este gen se expresó muy tenuemente o simplemente no se expresó en todos los sistemas de enraizamiento *in vitro*.

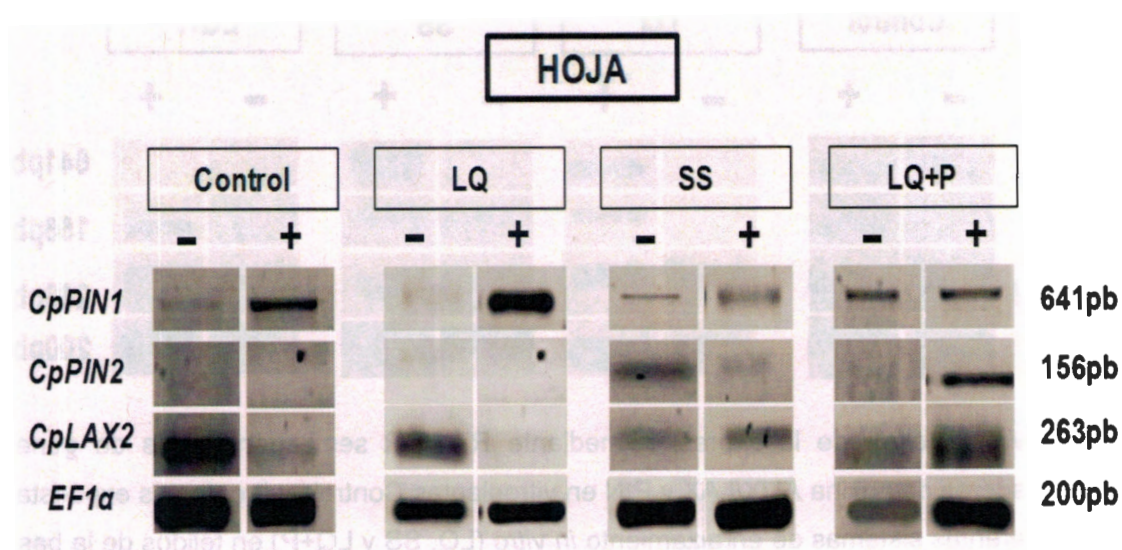


Figura IV.5. Análisis de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativos de genes transportadores de auxina AUX/LAX y PIN en vitroplantas Control y vitroplantas expuestas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) en tejidos de hoja de *Carica papaya* sin (-) y con 2 mg L⁻¹ de IBA exógena (+). pb: tamaño de amplicón.

El análisis RT-PCR semi-cuantitativos nos ayudó en explicar la expresión de genes AUX/LAX y PIN y su localización parcial en diferentes tejidos como raíz, base de tallo y hoja. El análisis de expresión reveló que los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* se expresan de manera mayoritaria en la raíz y en la base del tallo en las vitroplantas Controles y en los diferentes sistemas de enraizamiento cuando se le adiciona 2 mg L⁻¹ de IBA exógena. En efecto, *CpLAX2* se expresa en todos los tejidos, pero con mayor intensidad en las hojas, sin embargo, este gen en las vitroplantas Control con 2 mg L⁻¹ de IBA se observó un atrofio en la expresión en hoja. Para entender el significado biológico detrás de esta redundancia, es necesario seguir investigando los estímulos exógenos capaces de regular la expresión de genes AUX/LAX y PIN para poder determinar los gradientes de auxinas en los diferentes tejidos en plantas de *Carica papaya* L.

IV.6. DISCUSION

En este trabajo, analizamos la caracterización y análisis funcional de genes tipo AUX/LAX, y PINFORMED (PIN) en *Carica papaya*. El estudio pretende aclarar el papel de los transportadores de auxinas involucrados en el inicio y desarrollo de raíces en vitroplantas de *Carica papaya* en respuestas a diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro*. En el capítulo anterior se demostró mediante el análisis filogenético en la especie de *Carica papaya* que la familia AUX/LAX y PIN encontradas *in silico*, son dos familias de genes altamente conservadas, que pueden jugar un papel clave en el transporte polar de las auxinas. Los motivos altamente conservados de proteínas de la familia de AUX/LAX y PIN en los dominios transmembranal, puede ser una prueba adicional de que al menos pueden estar involucrados en el transporte polar de la auxina.

También existen reportes en este capítulo que sugieren que la mayoría de los PINs juegan un papel fundamental en la iniciación y crecimiento de tejidos como las raíces en plantas de *Arabidopsis thaliana* (PIN1 y PIN2) (Galweiler *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002). Las proteínas tipo PIN “de distancia larga” se localizan basalmente en la punta de la raíz, en tejidos vasculares de embriones, hojas y raíces mientras que se localizan apicalmente en el ápice del brote (Galweiler *et al.*, 1998; Benkova *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003b; Sorefan *et al.*, 2009). En plantas de *Arabidopsis thaliana* el gen PIN2 por otro lado está localizada apicalmente en la punta lateral de la raíz y células epidérmicas de la raíz y basalmente en las células de la corteza de la raíz (Muller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2003a).

En estudios de plantas de maíz se observó cierta especificidad mediante la expresión de PIN1 en raíces post-embrionarios, los genes PIN de maíz se expresan en la punta de la raíz y en su epidermis. La localización específica de *ZmPIN1a* fue confirmada a nivel de proteína mediante inmunolocalización de un línea reportera *ZmPIN1a:YFP*. Por otra parte se ha definido que en plantas de *Arabidopsis*, PIN2 se expresa desde la punta de la raíz hacia la zona de elongación de células epidérmicas de la raíz, en la que participa en la corriente basipetalo de auxina y su gravitropismo (Blilou *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007).

Por lo anterior, se sugiere que las proteínas *CpPIN1* y *CpPIN2* en *Carica papaya* también están implicadas en el transporte de auxinas específicamente con localización en las raíces, esto fue demostrado al observarse expresión génica de estos genes en raíces de las vitroplantas *in vitro* en casi todos los sistemas de enraizamiento analizados. Además, en relación con estos dos genes (*CpPIN1* y *CpPIN2*) en *Carica papaya*, se observó que su expresión aumentaba en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* cuando se adicionó 2 mg L⁻¹ de IBA, principalmente en tejidos de raíces y en la base de tallo de estas vitroplantas de papaya, mientras que se observó una expresión moderada con el gen transportador de entrada *CpLAX2* en todos los tejidos, creando cierta confianza de la funcionalidad de este gen en el transporte acropetal.

Se ha reportado que la expresión de PIN1 en plantas de *Arabidopsis* se expresan en las raíces y brotes de tejidos vasculares (Gälweiler *et al.*, 1998), es así como nuestros resultados mostraron un patrón de expresión similar a PIN1 en especies como arroz (*OsPIN1*) y de *Arabidopsis thaliana* (*AtPIN1*), lo que confirmó que *CpPIN1* y *CpPIN2* de *Carica papaya* se encuentra evolutivamente de manera más cercana a los PINs “de distancia larga” que a los PINs “de distancia corta” (Luschnig *et al.*, 1998). Con los reportes anteriores de Benková *et al.*, (2003), confirman nuestros estudios, los PINs “de distancia larga” son esenciales para la iniciación y desarrollo de primordios en las raíces laterales en vitroplantas de *Carica papaya*.

IV.7. CONCLUSIONES

- El rendimiento de RNA expresado en $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de PF fue mayor en plantas *in vitro* que plantas provenientes de semilla.
- Se observó que plántulas expuestas en los 3 sistemas de enraizamiento *in vitro* sin la presencia de IBA exógeno, se observó una escasa expresión de los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2* en la base del tallo (BT). También se observó que al adicionar IBA, la expresión de estos genes en la BT aumentó en forma considerable en los sistemas LQ y SS.
- El gen *CpPIN1* se expresó en tejidos de raíz y base de tallo en plantas Control sin y con IBA, sin embargo, este gen no se expresa en la base de tallo en los sistemas de enraizamiento sin IBA, mientras que en raíz consistentemente baja su expresión o esta presente con muy baja expresión en todos los sistemas de enraizamiento *in vitro*.
- El gen *CpPIN2* en tejido de base-tallo (BT) consistentemente aumenta su expresión en respuesta a IBA en todos los sistemas de enraizamiento *in vitro* (SS, LQ y LQ+P); este mismo gen en raíces consistentemente aumenta su expresión o esta expresado en todos los sistemas. De igual manera cuando estas plántulas no contenían esta fitohormona en su medio de cultivo se observó muy escasa expresión.
- El gen *CpLAX2* en los sistemas Controles se expresó casi de manera constitutiva en todos los tejidos, sin embargo, en tejido de hoja consistentemente baja su expresión en respuesta a IBA en todos los sistemas de enraizamiento *in vitro* (Control, LQ, SS y LQ+P).

IV.8. REFERENCIAS

- Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. and Friml J. (2003) Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**:591-602.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., *et al.* (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950.
- Bennett S.R.M., Alvarez J., Bossinger G. and Smyth D.R. (1995) Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **8**: 505-520.
- Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Lee O.R. *et al.* (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 131-147.
- Boerjan W., Cervera M.T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., van Onckelen H., Van Montagu M. and Inze D. (1995) Super root, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *The Plant Cell* **7**: 1405-1419.
- Bohn-Courseau, I. (2010). Auxin: a major regulator of organogenesis. *Jornal C. R. Biol.* **333**: 290-296.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. and Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
- Buer C.S. and Muday G.K. (2004) The transparent testa mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *The Plant Cell* **16**: 1191-1205.

- Celenza J.L., Jr Grisafi P.L. and Fink G.R. (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* **9**: 2131-2142.
- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T. and Masson P.H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 15112-15117.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P. *et al.* (2001) Auxin transport promotes arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell* **13**: 843-852.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G. and Bennett M.J. (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*. **8**: 165-171.
- Cho M., Lee S. and Cho H.T. (2007) P-Glycoprotein displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *The Plant Cell* **19**: 3930-3943.
- Davies P.J. (2004). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. and Jurgens G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**:147-153.
- Friml J., Benkova E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jurgens G., and Palme K. (2002a). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 661–673.
- Friml J., Wisniewska J., Benkova E., Mendgen K. and Palme K. (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809.

- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. and Jurgens G. (2003a). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153.
- Friml J., Benkova E., Mayer U., Palme K., and Muster G. (2003b). Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant Journal* **34**: 115-124.
- Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. and Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230.
- Geisler M. and Murphy A.S. (2006) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters*. **580**: 1094-1102.
- Laskowski M., Grieneisen V.A., Hofhuis H., *et al.* (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology* **6**: 307.
- Laskowski M.J., Williams M.E., Nusbaum H.C. and Sussex I.M. (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**: 3303-3310.
- Lewis D.R., Miller N.D., Splitt B.L., Wu G. and Spalding E.P. (2007) Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *The Plant Cell* **19**: 1838–1850.
- Leyser O. (2006) Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biology* **16**: R424-R433.
- Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P., Fink G.R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropismo in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development* **12**:2175-2187.

- Malamy J. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environment* **28**: 67-77.
- Malamy J. (2008) Lateral root development. In *Root Development* (Beeckman, T., ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Limited, in press.
- Marchant A., Bennett M.J. (1998) The *Arabidopsis* AUX1 gene: a model system to study mRNA processing in plants. *Plant Molecular Biology* **36**: 463-471.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P.J., Bennett M., Sandberg G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **14**: 589-597.
- Marchant A., Kargul J., May S. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal* **15**: 2066-2073.
- Muday G.K. and DeLong A. (2001) Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science* **6**: 535-542.
- Muday G.K. and Rahman A. (2007) Auxin transport and the integration of gravitropic growth. In *Plant Tropisms* (Gilroy, S. and Masson, P., eds). Oxford: Blackwell Publishing, pp. 47-78.
- Müller A., Guan C., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E. and Palme K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal* **17**: 6903-6911.
- Negi S., Ivanchenko M.G. and Muday G.K. (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**: 175-187.
- Noh B., Murphy A.S. and Spalding E.P. (2001) Multidrug resistance like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The*

Plant Cell **13**: 2441-2454.

Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J. and Shimura Y. (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. The Plant Cell **3**: 677-684.

Petrásek J. and Friml J. (2009) Auxin transport routes in plant development. Development. **136**: 2675-2688.

Rashotte A.M., DeLong A. and Muday G.K. (2001) Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. The Plant Cell **13**: 1683-1697.

Rashotte A.M., Poupart J., Waddell C.S. and Muday G.K. (2003) Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis*. The Plant Physiology **133**: 761-772.

Ruzicka K., Ljing K., Vanneste S., Podhorska R., Beeckman T., Friml J. and Benkova E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. The Plan Cell **19**: 2197-2212.

Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., *et al.* (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. Nature **426**: 255-260.

Sitbon F., Little C.H.A., Olsson O. and Sandberg G. (1992) Correlation between the expression of T-DNA IAA biosynthetic genes from developmentally regulated promoters and the distribution of IAA in different organs of transgenic tobacco. Physiology Plant **85**: 679-688.

Teale W., Paponov I., Ditengou F. and Palme K. (2005) Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. Physiology Plant Journal **123**: 130-138.

- Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B. *et al.* (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Cell* **17**: 2922-2939.
- Torrey J.G. (1976) Root hormones and plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*. **27**: 435-459.
- Wu G., Lewis D.R. and Spalding E.P. (2007) Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *The Plant Cell* **19** 1826-1837.
- Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E. (2006) High-affinity auxin transport by the *aux1* influx carrier protein. *Current Biology Journal* **16**: 1123-1127.
- Zazimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K. and Hosek P. (2010) Auxin transporters—why so many? *Cold Spring Harb. Perspect Biology* **2**: 1-14.

CAPITULO V

V.1. DISCUSIÓN GENERAL

Carica papaya es un cultivo valioso para la industria alimentaria, el problema de esta especie es la heterogeneidad que presentan sus frutos, debido a lo anterior, en condiciones de campo se realiza el sexado de plantas para garantizar plantaciones hermafroditas, estas plantas producen frutos "alargados" las cuales son las de interés comercial por parte del consumidor, sin embargo, el "sexado" conllevan a un gran gasto para el productor. Una de las soluciones para el caso de la papaya var. Maradol, es clonar *in vitro* plantas con características agronómicas sobresalientes en campo y así plantaciones 100% hermafroditas con frutos que son 100% alargados (Talavera *et al.*, 2009). Desafortunadamente el enraizamiento *in vitro* representa un problema en la micropropagación comercial de esta especie. Para superar el enraizamiento de papaya en condiciones *in vitro* hemos utilizado concentraciones de IBA para inducir raíces en vitroplantas de papaya (Drew, 1987; Drew *et al.*, 1993), de igual forma hemos creado diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* para asegurar mejorar los porcentajes de enraizamiento; los sistemas consisten en exponer a las vitroplantas en medio líquido (LQ), es decir, sin cantidades de agar, medio semisólido (SS) con la adición de agar como gelificante y sistemas en medio líquido provistos de sustratos de fibra de roca "plugs" (LQ+P), los sistemas se dividieron en dos grupos, sistemas que no contenían cantidades de IBA y sistemas que en sus medios se les adicionó 2 mg L^{-1} de IBA exógena. Nuestros resultados indicaron que plantas sin adición de IBA en el medio de cultivo no generaron raíces, por otra parte, la cantidad de IBA fue suficiente para producir raíces en plantas a las cuales se les adicionó esta fitohormona de enraizamiento. De igual forma el mejor tratamiento que produjo mejores raíces parecidas a las de una planta *in vivo* fue el sistema de enraizamiento líquido (LQ), en este sistema se generaron casi 7 raíces por plántula con longitudes de 1,45 cm, lo anterior a los 42 días de exponer a las vitroplantas en este medio de cultivo (LQ).

La auxina es un regulador clave del desarrollo de la planta y su distribución diferencial en los tejidos vegetales es establecido por un transporte polar (Transporte polar de auxina:

PAT) en respuesta a estímulos internos y externos que pueden desencadenar una amplia gama de procesos de desarrollo incluido la formación de raíces (Reinhardt *et al.*, 2000, Benkova *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Heisler *et al.*, 2005; Dubrovsky *et al.*, 2008), por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que subyacen en el transporte de auxina resulta de interés para conocer la evolución de este transporte PAT para conocer los procesos relacionados en la generación de raíces en plantas de *Carica papaya*. Los mecanismos moleculares involucrados en la acción del transporte polar de la auxina ya han sido elucidado en plantas modelos de *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998). La auxina se transporta por toda la planta a través de dos vías: (1) el transporte a larga distancia a través de las formas conjugadas entre floema- xilema, y (2) mediante el transporte a corta distancia (no conjugado), conocido como el transporte polar de la auxina (PAT). Por mucho, la mejor ruta estudiada, PAT es una forma de transporte activo intercelular mediada por proteínas insertadas en la membrana plasmática que pertenecen a tres familias distintas. Las familias PIN que codifican proteínas de eflujo (es decir, proteínas que facilitan el movimiento de las células), mientras que los miembros de la familia AUX/LAX facilitan la entrada de auxina en las células, junto con la difusión pasiva (Katekar y Geissler, 1980; Sussman y Goldsmith, 1981). Estos tipos de transporte se consideran polar debido a que los portadores de proteínas son a menudo colocados asimétricamente en la membrana plasmática (Sauer *et al.*, 2006; Titapiwatanakun y Murphy, 2009). En este sentido, nos dimos a la tarea de caracterizar la estructura y filogenia de genes homólogos tipo AUX/LAX y PIN en *Carica papaya* L., especulamos que sería factible que en *Carica papaya* estos genes homólogos a los de *Arabidopsis thaliana* también estén involucrados en la generación de raíces adventicias. Fue así como por primera vez identificamos y caracterizamos *in silico* la familia completa de genes tipo AUX/LAX encontrando cuatro genes en *Carica papaya* (CpAUX1, CpLAX1, CpLAX2, CpLAX3), así mismo, encontramos a la familia completa de genes tipo PIN en *Carica papaya* (CpPIN1, CpPIN2, CpPIN3, CpPIN4, CpPIN5 y CpPIN6), ambas familias presentaron homología relativamente alta al ser comparada con la planta modelo de *Arabidopsis thaliana*. Nuestro aislamiento de genes AUX/LAX en *Carica papaya* se observó un perfil de expresión idéntica y altos valores altos de identidad con respecto a sus homólogos en *Arabidopsis*, por lo tanto, deducimos que es probable que sean alelos, además se encontraron las regiones de la hélice transmembranal característico de estas secuencias. Con respecto al alineamiento

de genes *CpPINs* identificamos los residuos de Ser centralmente ubicados en tres motivos conservados TPRXS (N/S) de proteínas PINs, además, identificamos los motivos conservados TPRXS (N/S) presentes únicamente en el lazo hidrofílico de las proteínas de PINs “de distancia larga” de *Arabidopsis* y de *Carica papaya*, sin embargo, de las seis proteínas homólogas encontradas en *Carica papaya*, los PINs “de distancia corta” (*CpPIN5* y *CpPIN6*) no presentan estos motivos, lo que sugiere que la conservación funcional de los motivos solo se corresponde a los PINs “de distancia larga” en la especie de *Carica papaya*. Nuestro árbol filogenético logró establecer semejanzas sobre la posición de genes tipo AUX/LAX y PINs en *Carica papaya*, los genes *CpAUX1* y *CpLAX1* se posicionan en el mismo subclado con sus homólogos *AtAUX1* y *AtLAX1* de *Arabidopsis thaliana*, los genes *AtLAX2* y *CpLAX2* se encuentran en un sólo subclado, *CpLAX3* presentó alta homología con *AtLAX3*. Los genes PIN se agruparon de la siguiente manera: *CpPIN4* se agrupó con sus homólogos *AtPIN3*, *AtPIN7* y *AtPIN4*, *CpPIN1* y *AtPIN1* en un solo subclado, lo mismo para *CpPIN2* y *AtPIN2* los cuales se agrupan respectivamente. *CpPIN5* presenta una alta homología con *AtPIN5* de *Arabidopsis thaliana*, *AtPIN8* presentó alta homología con *CpPIN6* de *Carica papaya*, estos genes identificados como transportadores “cortos”.

De igual manera fue necesario conocer en donde estaban presentes estas secuencias AUX/LAX y PIN de *Carica papaya*, debido a esta incertidumbre decidimos evaluar los patrones de expresión de los genes transportadores de auxinas en vitroplantas *in vitro* de *Carica papaya* L. var Maradol en los diferentes sistemas de enraizamiento propuestos mediante análisis de RT-PCR semi-cuantitativo. Primeramente realizamos una expresión basal en plantas de papaya var. Maradol germinadas bajo condiciones *ex vitro*, la expresión basal nos arrojó información y detectó que sólo los genes *CpPIN1*, *CpPIN2*, y *CpLAX2* se utilizarían para evaluar la expresión génica de estos transportadores en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* debido a que los demás genes (*CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5*, *CpPIN6*, *CpAUX1*, *CpLAX1* y *CpLAX3*) mostraban expresión constitutiva. Las proteínas tipo *CpPIN1* y *CpPIN2* son PINs “de distancia larga”, es decir, que se localizan en la membrana plasmática y de manera basal se han encontrado en la punta de la raíz, tejidos vasculares de embriones, hojas y raíces (Galweiler *et al.*, 1998; Benkova *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003b; Reinhardt *et al.*, 2003; Sorefan *et al.*, 2009). *PIN2* de manera específica está localizada apicalmente en la punta lateral de la raíz y

células epidérmicas de la raíz y basalmente en las células de la corteza de la raíz. Para el caso del gen *CpLAX2* se ha reportado que está localizado en raíces y tejidos jóvenes como brotes (Muller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2003a).

Seguidamente se procedió a utilizar vitroplantas las cuales estaban en sus respectivos sistemas de enraizamiento *in vitro* (LQ, SS y LQ+P) con o sin la adición de 2 mg L⁻¹ de IBA. El análisis de RT-PCR semi-cuantitativos nos ayudó a explicar la expresión de genes AUX/LAX, PIN además de su localización en diferentes tejidos como raíz, base de tallo y hoja de papaya. El análisis de expresión reveló que muchos genes *CpPIN1*, *CpPIN2* se expresan de manera casi exclusiva en la raíz y base de tallo en las plantas Control y en los diferentes sistemas de enraizamiento cuando se le adiciona al medio de cultivo 2 mg L⁻¹ de IBA. De igual manera el análisis de RT-PCR indicó que al no exponer a las vitroplantas con IBA, los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2* no se expresaron en ningún tejido, lo anterior es factible de explicar debido a que las vitroplantas sin IBA no generaron raíces y por lo tanto, la ausencia de la auxina no estableció un buen transporte polar de auxina viéndose reflejado en la falta de expresión de los genes ya antes mencionados.

V.2. CONCLUSIÓN GENERAL

Se estableció que el medio líquido (LQ), que presentó la menor impedancia, es el mejor sistema de enraizamiento *in vitro* para vitroplantas de *Carica papaya* var. Maradol, porque al cabo 42 días se obtuvieron casi 7 raíces con longitudes de 1.45 cm por plántula.

Se identificó y caracterizó *in silico* la familia completa de genes AUX/LAX en *Carica papaya* L. la cual esta formada por cuatro miembros (*CpAUX1*, *CpLAX1*, *CpLAX2*, *CpLAX3*). De igual forma se caracterizó la familia completa de genes PIN encontrándose seis secuencias en esta familia (*CpPIN1*, *CpPIN2*, *CpPIN3*, *CpPIN4*, *CpPIN5* y *CpPIN6*). A las secuencias *CpAUX/LAX* se les encontró regiones de la hélice transmembranal característico de estas secuencias, mientras que para las secuencias de tipo *CpPIN* se identificó residuos de Ser centralmente ubicados en tres motivos conservados TPRXS (N/S), ubicados en el lazo hidrofílico característico de estas proteínas.

Se realizó análisis de RT-PCR semi-cuantitativo para evaluar la expresión de genes transportadores de auxinas y del gen de etileno en raíz, base de tallo y hojas en los diferentes sistemas de enraizamiento *in vitro* con y sin la adición de IBA en vitroplantas de *Carica papaya* L. var. Maradol. Se concluyó que vitroplantas a las cuales no se les adicionó IBA en su medio de cultivo presentan escasa expresión de los genes *CpPIN1*, *CpPIN2* y *CpLAX2*. Los genes *CpPIN1* y *CpPIN2* se presentan de manera casi exclusiva en tejidos de raíces y base de tallo en todos los sistemas de enraizamiento *in vitro* con IBA, mientras que el gen *CpLAX2* se expresó en casi todos los tejidos.

El mejor sistema de enraizamiento *in vitro* es cuando las vitroplantas están expuestas en medio líquido (sin agar), en comparación con los otros sistemas, las raíces producidas en medio LQ son lo más parecida a la de una planta *in vivo*. Las vitroplantas en sistema LQ presentaron alta expresión del gen *CpPIN1* en la base del tallo y alta expresión del gen *CpPIN2* en tejidos de raíz, esta característica de expresión fue única en este tipo de medio LQ, debido a que estos genes (*CpPIN1* y *CpPIN2*) se han reportados con localización exclusiva en el transporte polar auxínico en raíces, suponemos que estas plantas en medio LQ presentan raíces apropiadas que ayuden a la planta a aclimatarse bajo condiciones *ex vitro*.

Falta realizar más investigación para definir si el patrón de expresión de cambio en la expresión de *CpPIN1* y *CpPIN2* observado en plántulas tratadas con IBA y cultivadas en el sistema LQ, esta asociado a la mayor capacidad de rizogénica en sistemas *in vitro*.

V.3. PERSPECTIVAS

- Los estudios presentados en esta tesis de maestría servirán de base para la realización de futuras investigaciones orientadas a entender los mecanismos moleculares del transporte polar de auxinas en *Carica papaya* L.
- Caracterización anatómica e histológica de las raíces producidas en los diferentes sistemas y en respuesta a la aplicación exógena de IBA
- Es importante confirmar la caracterización de los niveles de expresión de los genes *CpAUX/LAX* y *CpPINs* en sistemas que inhiban o activen la expresión de auxinas mediante análisis con RT-qPCR en tiempo real.
- Realizar el análisis de inmunolocalización de los genes *CpAUX/LAX* y *CpPINs* en plántulas de *Carica papaya* L.

V.4. REFERENCIAS

- Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. and Friml J. (2003) Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**:591-602.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. and Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T. and Masson P.H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 15112-15117.
- Drew R.A. (1987) The effects of medium composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.) *Journal of Horticultural Science*. **62**: 551-556.
- Drew R.A. and Miller R.M. (1993) Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*. **64**: 767-773.
- Dubrovsky J.G., Gambetta G.A., Hernandez-Barrera A., Shishkova S., Gonzalez I. (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* **97**: 903-915.
- Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil, Ivanchenko S., Friml, M.G. (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**: 8790-8794.

- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. and Jurgens G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**:147-153.
- Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. and Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**: 2226-2230.
- Heisler M.G., Ohno C., Das P., Sieber P., Reddy G.V., Long J.A., Meyerowitz E.M. (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology Journal* **15**: 1899-1911.
- Katekar G.F. and Geissler A.E.(1980).Auxin transport inhibitors. *Plant Physiology* **66**: 1190-1195.
- Müller A., Guan C., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E. and Palme K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal* **17**: 6903-6911.
- Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., *et al.* (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255-260.
- Sauer M., Balla J., Luschnig C., Wisniewska J., Reinöhl V., Friml J. and Benková E. (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA- ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Development* **20**: 2902-2911.
- Sussman M.R. and Goldsmith M.H.M. (1981) The action of specific inhibitors of auxin transport on up take of auxin and binding of N-1-naphthylphthalamic acid to a membrane site in maize coleoptiles. *Planta* 13-18.

- Talavera C., Espadas F., Contreras F., Fuentes G. and Santamaría J.M. (2009) Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae* **812**: 373-378.
- Talavera, C., Espadas, F., Contreras, F. and Santamaría, J.M. (2007). Field performance of 100% hermaphrodite micropropagated papaya plants. 2nd International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Riviera Maya, Mexico. pp.219-222.
- Titapiwatanakun B. and Murphy A.S. (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *Journal Experimental Botany* **60**: 1093-1107.

