



Centro De Investigación Científica De Yucatán, A.C.

Posgrado En Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN
EN RESPUESTA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO,
DE GENES HOMÓLOGOS TIPO *SHINE* EN PAPAYA**

(*Carica papaya* L.)

Tesis que presenta

AMARANTA GIRÓN RAMÍREZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México, Febrero, 2015





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

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“Caracterización y análisis de expresión en respuesta a estrés por déficit hídrico, de genes homólogos tipo *SHINE* en papaya (*Carica papaya* L.)”** 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. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C



Mérida, Yucatán, México; Enero de 2015

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____


AMARANTA GIRON RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

Dos años significan en cuestión de tiempo el transcurso de 730 días, sin embargo, cuando cada uno de esos días conlleva a un nuevo aprendizaje, el tiempo se vuelve sigiloso y se convierte en un cúmulo de experiencias que te permiten crecer como ser humano y profesionalista. Este tiempo no sólo me ha permitido cristalizar una más de mis metas, llena de momentos gratificantes y otros un tanto tormentosos, sino que además, me ha dado la oportunidad de conocer y colaborar con personas que sin duda han hecho que de ésta una experiencia enriquecedora. Y llegado este momento, quiero agradecer a todas esas personas que contribuyeron al desarrollo de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número 355717 para realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por ser mi segunda casa de estudios en la que he podido cumplir una más de mis metas. Mi más sincero agradecimiento a todo el personal que labora en ésta institución por hacer de éste lugar un sitio de trabajo acogedor.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Agradezco la confianza otorgada para realizar la presente tesis, por el apoyo que siempre me ha brindado, por responder a mis dudas en cada una de las discusiones que hemos entablado y por acrecentar mi deseo de continuar en el quehacer científico.

A mi Comité Tutoral, conformado por los Dres. Carlos Trejo López, Inocencio Higuera Ciapara y Jorge Humberto Ramírez Prado, por cada una de las aportaciones realizadas en los tutorales que sin duda enriquecieron el presente trabajo.

A la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz por sus acertadas contribuciones a lo largo de este proyecto, por el constante intercambio de ideas, por su apoyo en el suministro de los materiales del laboratorio y en la revisión de este trabajo.

A los M.C. Carlos Talavera May y Francisco Espadas Gil, a ambos por compartir en todo momento su amplia experiencia en la medición y discusión de los parámetros fisiológicos

evaluados. Por preocuparse de cada uno de los experimentos realizados y ayudarme a responder a más de una interrogante. A ustedes mi cariño y reconocimiento por ser pilares importantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular.

A mis colegas y amigos, Arianna Chan León, Daniel Leal Alvarado, Fabio Idrovo Espín y Humberto Estrella Maldonado por ser sinónimo de amistad y cariño. Por acogerme en el grupo de trabajo desde el primer momento y no dejarme sola a pesar de que la adversidad forja el carácter. Por las enseñanzas, los proyectos en mente, los consejos académicos, por esas pláticas durante el café, por los buenos y malos ratos; pero sobre gracias por la amistad que hemos cultivado día a día.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Química Orgánica, en especial a la Q.B.B. Fabiola Erosa Escalante, por todo el apoyo brindado durante la extracción y cuantificación de ceras totales y en el análisis e interpretación de los perfiles cromatográficos. A todos, gracias por hacerme participe de su equipo de trabajo.

Al Biol. Felipe Barredo Pool, por su acertada contribución en la preparación de las muestras biológicas utilizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido.

Al Ing. Fernando Contreras Martín y a todo el personal del vivero del CICY por el apoyo técnico brindado en la realización de más de un experimento.

A todos mis compañeros y amigos del CICY, en especial a Edgar Gamaliel Itzá Kuk y Pablo José Palma Cancino, por ser esos extraños que se convirtieron en mi segunda familia lejos de casa, por las largas pláticas, por cuidarme siempre, quererme y soportarme otro poco, por dejarme ser siempre la abeja de la colmena. Pero sobre todo, gracias por brindarme su amistad incondicional desde el primer momento. Los quiero.

A los que aun estando lejos, han sido partícipes de este proyecto, porque durante estos dos años no hemos perdido la comunicación ni un solo instante y por el contrario hemos compartido éxitos y fracasos juntos. Por siempre recibirme con el mismo gusto y cariño sin importar el tiempo que pase.

DEDICATORIA

A **mis padres** por ser mi mayor fortaleza y ejemplo de superación constante. A ti mamá por ser mi guía y ejemplo de constancia, a ti que me has enseñado que nunca es demasiado tarde para terminar las tareas asignadas, por tus apapachos, por tener siempre esas palabras exactas de consuelo y ser esa persona a la que admiro con todo mi ser. A ti papá por ser mi más fiel consejero, ejemplo de trabajo, por tus palabras de apoyo y ser el ejemplo más bello que tengo de lucha ante la adversidad. A ustedes que me dieron estas alas que me han permitido seguir mis sueños y que sin importar lo lejos que me lleven ustedes están presentes siempre. Los amo.

A la familia **Girón**, que a pesar de la distancia siempre están pendientes y me dedican palabras de aliento para seguir adelante. A mis tías por cuidarme y compartir mis alegrías y tristezas. A mi tío por entusiasmarse con mis proyectos y compartir anécdotas que me recuerdan mis raíces y me motivan a continuar. A mis primos por su apoyo incondicional y a la nueva generación de sobrinos a ustedes todo mi amor.

A la gran familia **Ramírez**, que pese a las dificultades seguimos unidos como siempre, a mis tías, a cada una de ellas todo mi amor y admiración por enseñarme que cada día es una nueva oportunidad de salir y enfrentarse al mundo para ser mejores. A mi tío, por contagiarme el buen gusto por la música y por estar siempre para mí con tanto amor que no podría pagar todo lo que has hecho por mí y enumerarlo sería imposible. A cada uno de mis primos por ser mis hermanos y amarme tanto como yo a ustedes. A mi pequeña princesa por ser ese pedacito de Sol que siempre ilumina hasta el más difícil día de trabajo, por ser el motor que me impulsa a seguir superándome para poder llegar a ser un ejemplo para ti.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE ABEVIATURAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xxi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2

CAPÍTULO I

Introducción, Antecedentes Generales, Estrategia Experimental

I.1. INTRODUCCIÓN	3
I.2. ANTECEDENTES GENERALES.....	5
I.2.1. Origen y distribución de <i>Carica papaya</i> L.	5
I.2.2. Clasificación taxonómica	5
I.2.3. Descripción morfológica	6
I.2.3.1. Características de la Flor	7
I.2.3.2. Características de los Frutos.....	7
I.2.4. Requerimientos climáticos.....	8
I.2.4.1. Temperaturas.....	8
I.2.4.2. Luz.....	8
I.2.4.3. Suelo	9
I.2.4.4. Humedad	9
I.2.5. Importancia económica de Papaya en México.....	9
I.2.5.1. Producción de Papaya	11
I.2.5.2. Producción de Papaya en Yucatán	11
I.2.6. Déficit hídrico en la producción de Papaya	12
I.2.7. Factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico	14

1.2.8. Sobreexpresión de genes <i>SHINE</i> en plantas transgénicas y su efecto en la tolerancia al estrés abiótico	20
1.2.9. Genes <i>SHINE</i> involucrados en la tolerancia a estrés abiótico	22
1.3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	24
1.3.1. Preguntas de Investigación	24
1.3.2. Hipótesis	24
1.4. OBJETIVOS	25
1.4.1. Objetivo General	25
1.4.2. Objetivos Específicos	25
1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
1.6. BIBLIOGRAFÍA.....	27

CAPÍTULO II

Caracterización *in silico*, Estructura Y Filogenia De Genes Involucrados En La Tolerancia A Estrés Por Déficit Hídrico En El Genoma Secuenciado De Papaya Transgénica (*Carica papaya* L.) Var. Sunup

II.1. INTRODUCCIÓN	37
II.1.1. Familia de Factores de Transcripción AP2/ERF	38
II.1.2. Familia AP2/ERF en respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico	40
II.1.3. Genes <i>SHINE</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
II.1.4. Long Acyl-CoA Synthetase en <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
II.2. HIPÓTESIS.....	44
II.3. OBJETIVOS	44
II.3.1. Objetivo General	44
II.3.2. Objetivos Particulares.....	44
II.4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
II.4.1. Aislamiento <i>in silico</i> de genes tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45

II.4.2. Aislamiento <i>in silico</i> de genes tipo <i>CpShine</i> de <i>Carica papaya</i> L.....	45
II.4.3. Agrupamiento y selección de secuencias <i>CpShine</i> de <i>Carica papaya</i> L.....	46
II.4.4. Predicción de los Marcos de Lectura Abiertos (ORF)	46
II.4.5. Alineamiento de secuencias proteínicas predichas e identificación de dominios conservados de genes tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> var. SunUp	46
II.4.6. Modelaje tridimensional de las proteínas <i>CpShine1</i> y <i>CpShine2</i>	47
II.4.7. Análisis filogenéticos de las secuencias de genes <i>AtShine</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>CpShine</i> de <i>Carica papaya</i>	47
II.4.8. Diseño de oligonucleótidos de genes <i>CpShine</i> de <i>Carica papaya</i>	47
II.5. RESULTADOS	48
II.5.1. Identificación <i>in silico</i> de genes tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
II.5.2. Análisis filogenético de las secuencias de genes tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
II.5.3. Identificación <i>in silico</i> de genes tipo <i>SHINE</i> en <i>Carica papaya</i> L.	49
II.5.4. Alineamiento de proteínas tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de <i>Carica papaya</i> var SunUp.....	50
II.5.5. Porcentajes de identidad de las secuencias tipo <i>SHINE</i> de <i>Carica papaya</i> L.	52
II.5.6. Estructura tridimensional de las proteínas <i>CpShine1</i> y <i>CpShine2</i>	52
II.5.7. Análisis filogenético de las secuencias de genes <i>SHINE</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L.	53
II.5.8. Análisis <i>in silico</i> de genes tipo <i>LACS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp	54
II.5.8.1. Análisis filogenético de las secuencias de genes tipo <i>LACS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
II.5.8.2. Identificación <i>in silico</i> de genes tipo <i>LACS</i> en <i>Carica papaya</i> L.	57
II.5.8.3. Alineamiento de proteínas tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de <i>Carica papaya</i> var SunUp	58

II.5.8.4. Porcentajes de identidad de las secuencias <i>CpShine</i> de <i>Carica papaya</i> L...	60
II.5.8.5. Análisis filogenético de las secuencias de genes <i>LACS</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L.	61
II.5.9. Diseño de oligonucleótidos.....	62
II.6. DISCUSIÓN.....	64
II.7. CONCLUSIONES.....	68
II.8. BIBLIOGRAFÍA.....	70

CAPÍTULO III

Caracterización Del Efecto Por Déficit Hídrico Sobre La Fisiología De 2 Genotipos De *Carica papaya* L. Maradol Y Silvestre

III.1. INTRODUCCIÓN.....	79
III.1.1. Clasificación de los tipos de respuesta de la planta ante un estrés por déficit hídrico	80
III.1.2. Efectos fisiológicos ocasionados por el déficit hídrico en plantas	81
III.1.3. Estrés por déficit hídrico en <i>Carica papaya</i> L.....	82
III.2. HIPÓTESIS.....	84
III.3. OBJETIVOS.....	84
III.3.1. Objetivo General	84
III.3.2. Objetivos Específicos	84
III.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
III.4.1. Material Vegetal	85
III.4.2. Determinación de peso y dimensiones de los frutos	85
III.4.3. Germinación de las semillas.....	86
III.4.4. Experimentos	87
III.4.4.1. Caracterización del estrés por déficit hídrico.....	87

III.4.4.2. Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> Maradol y Silvestre	88
III.4.5. Análisis Fisiológico	89
III.4.5.1. Abscisión de Hojas.....	89
III.4.5.2. Crecimiento Relativo ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	89
III.4.5.3. Potencial Hídrico (Ψ_H)	89
III.4.5.4. Fotosíntesis (P_n).....	90
III.4.5.5. Densidad Estomática (DE).....	90
III.4.5.6. Fluorescencia de clorofila a (F_v/F_m)	90
III.4.5.7. Fuga relativa de iones (%)	90
III.5. RESULTADOS	91
III.5.1. Material vegetal	91
III.5.2. Caracterización de la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico.....	92
III.5.2.1. Potencial Hídrico (Ψ_H)	98
III.5.2.2. Fotosíntesis (P_n).....	100
III.5.2.3. Fluorescencia de clorofila a (F_v/F_m)	102
III.5.2.4. Fuga de electrolitos (%)	103
III.5.3. Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> Maradol y Silvestre.....	105
III.5.3.1. Potencial Hídrico (Ψ_H)	106
III.5.3.2. Fotosíntesis (P_n), Conductancia Estomática (g_s), CO_2 Intercelular (C_i) y Transpiración (E)	108
III.5.3.3. Densidad Estomática (DE).....	111
III.6. DISCUSIÓN.....	116
III.6.1. Caracterización del punto de estrés por déficit hídrico.....	116
III.6.1.1. Potencial Hídrico (Ψ_H)	118

III.6.1.2. Fotosíntesis (Pn).....	119
III.6.1.3. Fluorescencia de clorofila a (Fv/Fm)	120
III.6.1.4. Fuga de electrolitos (%)	121
III.6.2. Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> Maradol y Silvestre.....	123
III.6.2.1. Intercambio de gases.....	123
III.6.2.2. Densidad Estomática	124
III.7. CONCLUSIONES.....	126
III.8. BIBLIOGRAFÍA.....	128

CAPÍTULO IV

Análisis Y Cuantificación De Ceras Totales Presentes En Hojas De *Carica papaya* L. Maradol Y Silvestre En Respuesta A Un Estrés Por Déficit Hídrico.

IV.1. INTRODUCCIÓN.....	136
IV.1.1. Estructura de la Cutícula.....	137
IV.1.2. Ceras epicuticulares e intracuticulares	138
IV.1.3. Propiedades de las ceras cuticulares.....	139
IV.2. HIPOTESIS	141
IV.3. OBJETIVOS.....	141
IV.3.1. Objetivo General	141
IV.3.2. Objetivos Específicos.....	141
IV.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	142
IV.4.1. Material Biológico.....	142
IV.4.2. Extracción de Ceras Totales en folíolos de <i>Carica papaya</i>	142
IV.4.3. Cuantificación de Área Foliar	143
IV.4.4. Análisis de ceras totales por Cromatografía de Gases.....	143
IV.4.5. Análisis de ceras por Cromatografía de Gases Masa.....	144

IV.4.6. Preparación de muestras biológicas para Microscopía	144
IV.5. RESULTADOS.....	145
IV.5.1. Extracción y cuantificación de ceras totales	145
IV.5.2. Perfiles Cromatográficos	148
IV.5.3. Microscopía Electrónica de Barrido.....	153
IV.6. DISCUSIÓN	157
IV.7. CONCLUSIONES.....	162
IV.8. BIBLIOGRAFÍA	164

CAPÍTULO V

Análisis De Expresión De Genes *Cpshine* Y *Cplac* En *carica Papaya* L. Maradol Y Silvestre En Respuesta A Déficit Hídrico

V.1. INTRODUCCIÓN	173
V.1.1. Biosíntesis de ceras.....	174
V.1.2. Genes involucrados en la biosíntesis de ceras cuticulares.....	175
V.2. OBJETIVOS.....	177
V.2.1. Objetivo General	177
V.2.2. Objetivo Particular.....	177
V.3. HIPOTESIS	177
V.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	178
V.4.1. Material Vegetal	178
V.4.1.1 Colecta de tejido vegetal adulto.....	178
V.4.1.2 Colecta de tejido vegetal joven	178
V.4.1.3. Grupos de tratamientos sometidos a estrés por déficit hídrico.	179
V.4.2. Extracción de RNA.....	180
V.4.3. Síntesis de cDNA.....	180
V.4.4. Análisis de RT-PCR	181

V.4.5. Electroforesis de RNA.....	181
V.5. RESULTADOS.....	182
V.5.1. Análisis de calidad de RNA.....	182
V.5.2. Prueba de Oligonucleótidos	185
V.5.3. Expresión Basal de genes <i>CpShine1</i> , <i>CpShine2</i> , <i>CpLac2</i> y <i>CpLac3</i> en plantas adultas de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre.....	187
V.5.4. Expresión diferencial de <i>CpShine1</i> , <i>CpShine2</i> , <i>CpLac2</i> y <i>CpLac3</i> , en plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a un estrés por déficit hídrico.....	189
V.6. DISCUSIÓN	194
V.7. CONCLUSIONES.....	199
V.8. BIBLIOGRAFÍA	201

CAPÍTULO VI

Discusión General

VI.1. DISCUSIÓN GENERAL	205
VI.1.1. Análisis bioinformático y búsqueda de los genes <i>SHINE</i> y <i>LACS</i> para el estudio de su expresión bajo estrés por déficit hídrico en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre.....	206
VI.1.2. Efecto sobre la fisiología en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre por la exposición a un estrés por déficit hídrico.....	207
VI.1.3. Efecto sobre los patrones de expresión de los genes <i>CpShine</i> y <i>CpLac</i> en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre en respuesta a un estrés por déficit hídrico.....	213
VI.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	215
VI.3. PERSPECTIVAS.....	218
VI.4. BIBLIOGRAFÍA	219
VII.1. ANEXOS	222

ÍNDICE DE ABEVIATURAS

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
Aa	aminoácidos
AP2/ERF*	APETALA/Ethylene Responsive Factor
At	Arabidopsis thaliana
R	Arginina
BLAST*	Basic Local Alignment Search Tool
BioEdit*	BioEdit Secuence Alignment Editor
CO₂	Bióxido de carbono
Cp	Carica papaya L.
cm	Centímetro
CTAB*	Cetyltrimethyl ammonium bromide
MgCl₂	Cloruro de magnesio
Gs	Conductancia estomática
GC	Cromatografía de Gases
GC/MS	Cromatografía de Gases-Masas
Cv	Cultivar
dNTPs*	Deoxyribonucleotide triphosphates
DBD*	Dna-Binding Domain
ERF	Factores de Respuesta al Etileno
FTs	Factores de Transcripción
Fm	Fluorescencia máxima de la clorofila
F0	Fluorescencia mínima de la clorofila
G	Gramo
Ha	Hectáreas
H	Hora
L	Litro
LACS	Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase
MM	Marcador de peso Molecular

Mb	Megabases
M	Metros
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mpb	Millones de pares de bases
Min	Minutos
NCBI*	National Center for Biotechnology Information
ORF*	Open Reading Frame
pb*	pares de bases
Fv/Fm	Relación entre la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y F_m
Tm	Temperatura de alineamiento
TAIR*	The Arabidopsis Information Resource
Y	Tirosina
T	Toneladas
W	Triptófano
TAE	TRIS-Acetate-EDTA

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

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
I.1. Corte longitudinal de un fruto de <i>Carica papaya</i> L. Maradol. Se observa la presencia de las semillas en el interior (Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular, 2013).....	6
I.2. Partes vegetativas de un ejemplar de <i>Carica papaya</i> L. (a) Sección transversal del tallo de una planta adulta. (b) Lámina foliar y peciolo. (c) Sección longitudinal del tallo en planta joven. (d) Sección longitudinal del tallo en planta adulta. (e) Tallo de planta adulta que muestra las cicatrices conspicuas que dejan los peciolo al caer (Jiménez <i>et al.</i> , 2014).....	7
I.3. Principales estados productores de Papaya en México. Producción agrícola para 2013, Riego + Temporal (SIAP, 2014).....	10
I.4. Principales países productores de Papaya a nivel mundial. Promedio 2007-2011 (FAOSTAT, 2014).....	11
I.5. Porcentaje de área afectada con una o varias categorías de sequía en México (CONAGUA, 2014).....	13
I.6. Respuesta de la planta al estrés abiótico (adaptado de Ambika <i>et al.</i> , 2008).....	15
I.7. Estructura tridimensional del dominio AP2/ERF en <i>Arabidopsis thaliana</i> (Allen <i>et al.</i> , 1998).....	17
I.8. Árbol filogenético de las proteínas ERF reportadas para <i>Arabidopsis thaliana</i> (Nakano <i>et al.</i> , 2006). La clasificación propuesta por Sakuma <i>et al.</i> , (2002) está indicada en paréntesis.....	19
I.9. Alineamiento de aminoácidos de tres proteínas AtShine de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Las tres secuencias contienen un dominio AP2 en su región N-terminal, un motivo conservado "mm" y un motivo "cm" conservado. El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el gris claro corresponde a aminoácidos similares en un 50% (BioEdit, 2013).....	21

I.10.	Metodología general de la tesis "Caracterización y análisis de expresión en respuesta a estrés por déficit hídrico, de genes homólogos tipo <i>SHINE</i> en papaya (<i>Carica papaya</i> L.)".....	26
II.1.	División de la familia AP2/ERF de acuerdo a la estructura del dominio AP2 (adaptado de Nakano <i>et al.</i> , 2006). Se señala la ubicación de los genes <i>SHINE</i> en base a ésta clasificación.....	39
II.2.	Árbol filogenético en el que se observan las secuencias de genes <i>SHINE</i> presentes en <i>Arabidopsis thaliana</i> ; donde <i>Shine2</i> y <i>Shine3</i> presentan un mayor porcentaje de identidad (71%), mientras que <i>Shine1</i> y <i>Shine2</i> tienen la menor identidad (55%) entre las tres proteínas.....	49
II.3.	Alineamiento de las secuencias de genes tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtShine1</i> , <i>AtShine2</i> y <i>AtShine3</i>) y las secuencias homólogas <i>CpShine</i> del genoma de <i>Carica papaya</i> var. SunUp (<i>CpShine1</i> y <i>CpShine 2</i>). Se distingue un dominio AP2 (morado), una región N-Terminal ("mm") (verde) y una región C-Terminal ("cm") (naranja). Las flechas azules corresponden a las láminas β , y el espiral a la hélice α . Los asteriscos rojos corresponden a los residuos de Triptófano (W) y Arginina (R) conservados en las secuencias. El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el blanco corresponde a aminoácidos diferentes.....	51
II.4.	Análisis de la estructura tridimensional de los dominios de unión AP2/ERF de cada secuencia de estudio. A) Estructura del dominio AP2/ERF de <i>AtERF1</i> descrito por Allen <i>et al.</i> , (1998). B) Estructura del dominio AP2/ERF de <i>CpShine1</i> . C) Estructura del dominio AP2/ERF de <i>CpShine2</i> . En las tres imágenes se pueden observar las 3 estructuras β -plegada y la estructura α -hélice características del dominio AP2.....	53
II.5.	Árbol filogenético donde se muestran las relaciones que existen entre las tres secuencias tipo <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (●) y las dos secuencias de <i>Carica papaya</i> L. (●).....	54
II.6.	Árbol filogenético en el que se observa la relación filogenética entre las 9	

secuencias de genes <i>LACS</i> presentes en <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
II.7. Alineamiento de las secuencias de genes tipo <i>LACS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtLac1</i> <i>AtLac2</i> , <i>AtLac3</i> , <i>AtLac4</i> , <i>AtLac5</i> , <i>AtLac6</i> , <i>AtLac7</i> , <i>AtLac8</i> y <i>AtLac9</i>) y de secuencias homólogas <i>CpLac</i> del genoma de <i>Carica papaya</i> var. SunUp (<i>CpLac1</i> , <i>CpLac2</i> , <i>CpLac3</i> , <i>CpLac4</i> , <i>CpLac5</i> , <i>CpLac6</i> y <i>CpLac7</i>). Se distinguen tres bloques (I, II y III) correspondientes al dominio de unión AMP-binding domain (cuadros naranjas). Las flechas rojas indican los sitios del "Linker domain" característico de la familia <i>LACS</i> . El asterisco rojo, corresponde al residuo de Tirosina (Y) conservado en las secuencias. El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el blanco corresponde a aminoácidos diferentes.....	59
II.8. Árbol filogenético donde se muestran las relaciones que existen entre las 9 secuencias tipo <i>LACS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (●) y las 7 secuencias de <i>Carica papaya</i> (●). Se señalan los genes de interés (<i>CpLac2</i> y <i>CpLac3</i>) para este estudio.....	61
III.1. Mapa del Estado de Yucatán. Se indican los puntos de colecta del material biológico de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre (INEGI, 2013).....	85
III.2. Distribución de individuos de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre, utilizadas en la caracterización de la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico.....	87
III.3. Distribución de individuos dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre, utilizadas en la evaluación de la exposición al estrés por déficit hídrico.....	88
III.4. Condiciones ambientales: Humedad Relativa (%), DFFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) registradas dentro de la cámara de germinación durante el experimento: Caracterización del estrés por déficit hídrico (Período: Septiembre-Octubre, 2013).....	91

III.5.	Plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a un estrés por déficit hídrico a diferentes tiempos: planta control, 7 días sin riego, 14 días sin riego, 21 días sin riego y 28 días sin riego.....	93
III.6.	Abscisión de hojas en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> Maradol y Silvestre. A) Plantas Control. B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d) y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. En las plantas Control se mantuvo el riego normal (50 mL cada dos días). Los datos son el resultado de 3 plantas con 3 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW). Letras diferentes indican una diferencia significativa en cada tiempo de exposición.....	94
III.7.	Plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. Los incisos A) y B) , corresponden a plantas expuestas a un estrés por déficit hídrico de 21 días.....	96
III.8.	Crecimiento Relativo $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ en plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. A) Control. B) Plantas expuestas a los diferentes periodos de tiempo sin riego (7,14 y 21 d); y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. La tasa de crecimiento relativo (RGR) fue determinada utilizando la ecuación propuesta por Hoffman (2002) $\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$. Los datos son el resultado de 3 réplicas cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cada tiempo de exposición.....	97
III.9.	Potencial Hídrico (MPa) en plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. A) Plantas control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.....	99

III.10.	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. A) Plantas control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Para las plantas utilizadas como control se mantuvo el riego normal (50 mL cada dos días). Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.....	101
III.11.	Fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) en plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. A) Plantas control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. En las plantas utilizadas como control se mantuvo el riego normal (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.....	103
III.12.	Fuga de electrolitos (%) en plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. A) Plantas Control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.....	104
III.13.	Plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a estrés por déficit hídrico a diferentes tiempos sin riego: Planta control, 7 días sin riego y 14 días sin riego. Y un periodo de recuperación de 21 días. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento.....	106
III.14.	Potencial Hídrico (MPa) en plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L.	

Maradol y Silvestre. A) Control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (0, 7 y 14 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.....	108
III.15. Intercambio de gases en hojas de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre, bajo estrés por déficit hídrico a diferentes períodos sin riego (0, 7 y 14 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. A) Fotosíntesis, B) Conductancia estomática, C) CO ₂ intercelular y D) Transpiración. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.....	110
III.16. Efecto del estrés por déficit hídrico sobre la A) densidad estomática, y B) largo del estoma en plantas de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (0 y 21 d) y un tratamiento de recuperación de 7 días (28 d) después de restablecido el riego Los datos son el resultado de 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW). Letras diferentes indican una diferencia significativa en cada tiempo de exposición.....	112
III.17. Correlación polinomial cuadrática entre los valores de fotosíntesis y potencial hídrico para plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol (A) y Silvestre (B) expuestas a tratamientos de estrés por déficit hídrico (0, 7 y 14 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego.....	114
IV.1. Corte transversal de células epidérmicas secretando ceras, se observan los componentes de la cutícula, los dominios de la pared celular y las células epidérmicas no fotosintéticas (Kunst y Samuels, 2003).....	137

IV.2.	Principales funciones de la cutícula en las plantas (Tafolla <i>et al.</i> , 2013).....	139
IV.3.	Distribución de plantas de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre, utilizadas en la determinación del tratamiento de estrés por déficit hídrico.....	142
IV.4.	Rendimiento de ceras totales extraídas con Hexano (C ₆ H ₁₄), en individuos de <i>Carica papaya</i> L. de ambos genotipos: A) Plantas control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (14 y 21 d) y 1 semana de restablecido el riego (28 d) C) Rendimiento total de ceras obtenidos al día 21. Individuos pertenecen al grupo control con una edad de 90 días, el riego consistió en 50 mL cada 2 días. Los datos son el resultado de 1 repetición con 3 réplicas cada una. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento.....	147
IV.5.	Cromatogramas representativos obtenidos mediante cromatografía de gases al día 21 de cada genotipo A) Maradol y B) Silvestre, los números representan los componentes nombrados de acuerdo a su tiempo de retención.....	149
IV.6.	Cromatogramas representativos obtenidos por Cromatografía de Gases-Masa al día 21 de estrés para cada genotipo A) Maradol y B) Silvestre, los números representan los componentes 1, 2, 3, 4, 5 y 6 según tiempo de retención.....	150
IV.7.	Principales grupos detectados mediante CG/MS en hojas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. A) Ceras totales. B) Alcanos. C) Triterpenos. Las mediciones de los extractos cerosos se realizaron tomando hojas del estrato medio de la planta en los diferentes tiempos Los datos son el resultado de 1 repetición con 3 réplicas cada una. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento.....	152
IV.8.	Deposición de ceras epicuticulares en la superficie abaxial de la lámina foliar de <i>Carica papaya</i> L. (A-C) Maradol y (D-F) Silvestre, expuestas a diferentes tratamientos: A) y D) Planta Control; B) y E) Déficit Hídrico 14 días; C) y F) Recuperación día 21. Escala de barra= 5 µm.....	155
IV.9.	Deposición de ceras epicuticulares en la superficie adaxial de la lámina foliar de	

	<i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre, expuestas a diferentes tratamientos: A) y D) Planta Control; B) y E) Déficit Hídrico 14 días; C) y F) Recuperación día 21. Escala de barra= 100 μ m.....	156
V.1.	Ruta de biosíntesis de ceras. Se distinguen tres etapas: síntesis de <i>nov</i> o de ácidos grasos, elongación de los ácidos grasos (FAE) y transporte de monómeros hacia el exterior de la pared celular. Se señala la ubicación de los genes <i>LACS</i> dentro de la ruta de biosíntesis de ceras (Tafolla <i>et al.</i> , 2013).....	175
V.2.	Distribución de los grupos de plantas analizadas. Los recuadros indican el tipo de grupo a que corresponde y los tejidos muestreados. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 14.....	179
V.3.	Unidades ribosomales (28S y 18S) de RNA extraído de tejido vegetal (Raíz (R), Tallo (T), Hoja (H), Flor (F) y Cáscara de Fruto (C)) de plantas adultas de dos genotipos de <i>C. papaya</i> L. Maradol y Silvestre. Electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 1.5%, teñido con bromuro de Etidio.....	184
V.4.	Amplificación de 4 genes: <i>CpShine1</i> , <i>CpShine2</i> , <i>CpLac2</i> , <i>CpLac3</i> en tejido (hoja) de planta control de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol. Debajo cada banda de amplificación se indica los pesos en bp. Se utilizó como control el gen constitutivo <i>CpEF1α</i> , el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1Kb plus. Gel al 1.5 de Agarosa, teñido con Bromuro de Etidio.....	186
V.5.	Análisis por RT-PCR de gradiente de 4 genes: <i>CpShine1</i> , <i>CpShine2</i> , <i>CpLac2</i> y <i>CpLac3</i> en tejido de Hoja de una planta adulta de <i>C. papaya</i> L. Maradol. En los recuadros del margen izquierdo se indica el nombre de cada gen y en el derecho el tamaño de banda esperado en pb. Los recuadros superiores indican las temperaturas analizadas que fueron (de izquierda a derecha): 53, 55, 57, 59 y 61 °C. Se utilizó marcador de peso molecular (MM) de 1Kb. Gel al 1.5 de Agarosa, teñido con Bromuro de Etidio.....	187
V.6.	Expresión basal de 4 genes en diferentes de plantas adultas (1 año de edad) de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a condiciones de riego constante. Los recuadros superiores indican el tejido analizado tejido (R : Raíz; T : Tallo; H : Hoja; F : Flor; y C : Cáscara fruto) Los recuadros del margen	

	izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue <i>CpEF1α</i> . El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.....	188
V.7.	Expresión de 4 genes en raíz de plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico (recuadros superiores) que fueron de: 0, 7 y 14 d y a dos periodos de recuperación: 1 d y 7 d. Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue <i>CpEF1α</i> . El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.....	190
V.8.	Expresión de 4 genes en tallo de plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico (recuadros superiores) que fueron de: 0, 7 y 14 d y a dos periodos de recuperación: 1 d y 7 d. Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue <i>CpEF1α</i> . El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.....	191
V.9.	Expresión de 4 genes en Hoja de plantas jóvenes de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico (recuadros superiores) que fueron de: 0, 7 y 14 d y a dos periodos de recuperación: 1 d y 7 d. Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue <i>CpEF1α</i> . El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.....	193

VI.1.	Esquema de integración. Respuesta anatómica, fisiológica y molecular en hojas de plantas jóvenes de dos genotipos de <i>C. papaya</i> L. Maradol y Silvestre a un estrés por déficit hídrico. La parte superior corresponde a la caracterización de diferentes parámetros fisiológicos afectados por el estrés por déficit hídrico. La parte inferior corresponde a los diferentes patrones de expresión de los genes <i>CpShine1</i> , <i>CpShine2</i> , <i>CpLac2</i> y <i>CpLac3</i> en hoja de dos genotipos de <i>C. papaya</i> L. Maradol y Silvestre.....	214
--------------	--	------------

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
I.1. Clasificación taxonómica de <i>Carica papaya</i> L.....	5
I.2. Factores de transcripción miembros de la súper familia AP2/ERF asociados a diferentes tipos de estrés.....	16
I.3. Revisión de literatura de genes <i>SHINE</i> reportados en la biosíntesis de ceras cuticulares para diferentes especies.....	23
II.1. Secuencias tipo <i>SHINE</i> y locus en <i>Arabidopsis thaliana</i> obtenidas de la base de datos del NCBI.....	48
II.2. Genes homólogos tipo <i>SHINE</i> de <i>Carica papaya</i> que presentaron porcentajes significativamente altos de identidad con respecto a los genes <i>SHINE</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
II.3. Porcentajes de identidad entre las tres secuencias proteicas <i>AtShine</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y las dos secuencias de la familia de genes <i>CpShine</i> de <i>Carica papaya</i> var. SunUp.....	52
II.4. Secuencias tipo <i>LACS</i> y locus en <i>Arabidopsis thaliana</i> obtenidas de la base de datos del NCBI.....	55
II.5. Genes de <i>Carica papaya</i> var. SunUp que presentaron porcentajes significativamente altos con respecto a los genes <i>LACS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
II.6. Porcentajes de identidad entre las nueve secuencias proteicas <i>AtLac</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y las siete secuencias de la familia de genes <i>CpLac</i> de <i>Carica papaya</i> var. SunUp.....	60
II.7. Diseño de oligonucleótidos de las secuencias de <i>CpShine1</i> , <i>CpShine2</i> , <i>CpLac2</i> y <i>CpLac3</i> en <i>Carica papaya</i> L.....	63
IV.1. Principales componentes alifáticos en ceras cuticulares (modificado de Kunst y Samuels, 2003).....	138

IV.2.	Valores medios obtenidos de la extracción de ceras totales en <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre. La desviación estándar corresponde a 3 réplicas por cada tratamiento. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento.....	146
IV.3.	Estructura de los componentes detectados en los perfiles cromatográficos de <i>Carica papaya</i> L. por espectrometría de Gases-Masa.....	151
V.1.	Cuantificación del RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído en diferentes tejidos de plantas adultas de <i>Carica papaya</i> L. Maradol y Silvestre cultivadas en condiciones de riego constante.....	182
V.2.	Cuantificación del RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído en diferentes tejidos de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. Maradol expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico.....	183
V.3.	Cuantificación del RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído en diferentes tejidos de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico.....	183
V.4.	Tamaño esperado de amplicón (pb) y T_m ($^{\circ}\text{C}$) para cada juego de oligonucleótido diseñado para los genes de interés de este estudio en <i>Carica papaya</i> L.....	185

RESUMEN

El cambio climático ha traído consigo un aumento en las temperaturas, salinidad del suelo y el desabasto de agua en muchas partes del mundo. El estrés por déficit hídrico limita considerablemente la productividad agrícola hasta en un 70% el volumen total de muchos cultivos comerciales, incluida papaya. *Carica papaya* L. es considerada como una fruta de gran importancia a nivel mundial y a pesar de ser considerada un cultivo relativamente tolerante al déficit hídrico, puede presentar bajas en su producción de hasta un 50% bajo condiciones limitantes de agua (SENASICA, 2012; Hewezi *et al.*, 2008; Boyer, 1982).

En la presente tesis se reporta por primera vez la caracterización *in silico*, identificación y relación filogenética de la familia completa de genes *SHINE* en *C. papaya* L. var. SunUp. Se aislaron en total 2 secuencias nucleotídicas dentro del genoma secuenciado de *C. papaya* L. (*CpShine*) homólogas a las de *Arabidopsis thaliana* (*AtShine*). A partir de los alineamientos, se observó la presencia del dominio AP2 y los motivos "N-terminal" y "C-terminal" característicos del clado y se estableció la relación filogenética.

Para estudiar el efecto del estrés por déficit hídrico sobre la fisiología, morfología y expresión de 2 genes en dos genotipos de *C. papaya* L.: susceptible (Maradol) y tolerante (Silvestre); se impuso un tratamiento de estrés por déficit hídrico de 14 días seguido de un periodo de 7 días de recuperación, después de restablecer el riego. Fisiológicamente, en el tiempo de estrés máximo hubo una menor afectación en la tasa fotosintética del genotipo Silvestre en comparación con Maradol, de igual forma la capacidad de recuperación fue más evidente en Silvestre. Morfológicamente, se observó mayor capacidad de acumular ceras en los folíolos del genotipo Silvestre en respuesta al estrés. Las afectaciones fisiológicas fueron acompañadas por cambios en los patrones de expresión de los genes *CpShine*, lo que indica que tienen un papel fundamental en la ruta de biosíntesis de ceras en respuesta al estrés por déficit hídrico.

Nuestros resultados sugieren que los genes *CpShine* están involucrados en la biosíntesis de ceras en *C. papaya*, lo que permite la acumulación de ceras y confiere tolerancia al estrés por déficit hídrico. De los genotipos evaluados, ambos presentaron una tolerancia al estrés, sin embargo la capacidad de Silvestre de prender genes relacionados con una mayor tolerancia a dicho estrés antes que Maradol, indican que Silvestre es más tolerante a un estrés por déficit hídrico.

ABSTRACT

Climate change has resulted in an increase in temperature, soil salinity and drought in many parts of the world. The water stress significantly limits agricultural productivity by up to 70% of the total volume of many commercial crops, including papaya. *Carica papaya* L. is considered by many as a fruit of great importance worldwide and despite being considered as a drought tolerant crop, it may have 50% lower yields under water limiting conditions (SENASICA, 2012; Hewezi *et al.*, 2008; Boyer, 1982).

In this thesis, for the first time we reported, the identification *in silico*, characterization, and phylogenetic relationship of the entire family of *SHINE* genes in *C. papaya* L. cv. SunUp. Two new genomic sequences (*CpShine*) showing homology to Arabidopsis *SHINE* transcription factors were found within the genome of *C. papaya* cv. SunUp. Translated nucleotide alignment among 3 *AtShine* and 2 *CpShine* members, showed conserved amino acids in equivalent positions along the 5 sequences considered. The presence of a highly conserved AP2 domain and two conserved motif "N-terminus" and "C-terminus" were found. Based on the sequences alignment, a phylogenetic tree was generated to evaluate the evolutionary relationships of Arabidopsis *SHINE* members and their orthologs in papaya.

Two *C. papaya* genotypes of contrasting putative drought tolerance: Maradol (susceptible) and "Silvestre"; wild (tolerant) were subjected to a water deficit stress treatment by suspending irrigation during 14 days. Thereafter, plants were regularly re-watered. The response of both genotypes was characterized in morphological, physiological and molecular terms. Morphologically, the wild genotype show higher leaf retention, higher turgidity and a higher wax accumulation than Maradol. Physiologically, at the end of the stress period, the photosynthetic rate was drastically reduced in Maradol compared to Silvestre. On the other hand, after re-hydration Silvestre recovered completely its photosynthetic machinery function while Maradol was not able to do so. In addition, Silvestre showed a faster and higher expression of *CpShine* genes than Maradol in response to water deficits.

Our results suggest that *CpShine* genes are involved in wax biosynthesis in *C. papaya*, allowing the accumulation of wax in response of water stress. Both genotypes evaluated, showed tolerance to water stress, however the ability of Silvestre to turn on genes related to stress tolerance before Maradol, favored an increased amount of waxes in leaves, this suggests that Silvestre is more tolerant to water stress than its commercial counterpart.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN RESPUESTA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO, DE GENES HOMÓLOGOS TIPO *SHINE* EN PAPAYA (*Carica papaya* L.)

I.1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es considerada por muchos como una fruta de gran importancia a nivel mundial debido a su multiplicidad de usos, que van desde el artesanal, forrajero, insecticida, ornamental hasta el medicinal; siendo su principal destino la comercialización y consumo del fruto fresco debido a su contenido de pro-vitamina A. El valor nutritivo de papaya se debe a que es fuente de antioxidantes, fibra, minerales y vitaminas; por lo que su ingesta diaria es altamente recomendable. Además, contiene la enzima papaína, utilizada como ingrediente en la industria cárnica, cervecera, cosmética y farmacéutica (Evans y Ballen, 2012; Teixeira *et al.*, 2007; Claridades Agropecuarias, 1999).

Aunque se desconoce el lugar exacto de origen de *C. papaya*, se considera originaria de la región de Centroamérica y su producción se ha extendido a la mayor parte de los países tropicales y subtropicales del mundo (FAO, 2012; SENASICA, 2012). A nivel mundial el 79.69% de su producción se concentra en seis países: India, Brasil, Indonesia, República Dominicana, Nigeria y México (datos para el 2012, FAOSTAT, 2014). Entre los principales exportadores reportados para el 2011, México ocupó el primer lugar con 104,000 t que representa el 57% del volumen de exportación mundial, con un valor de 46 millones de dólares (FAOSTAT, 2014). A la fecha nuestro país se ha mantenido como el principal exportador de papaya, lo que representa una alternativa económica atractiva para el sector agrícola por la alta rentabilidad que proporciona a los agricultores y al período corto que tiene entre la siembra y cosecha (Gobierno del Estado de Yucatán, 2012; SAGARPA, 2010).

El cultivo de papaya requiere de una precipitación media de 1 500 mm anuales y una temperatura promedio de 25 °C para su buen desarrollo y fructificación; de hecho, el agua es el principal contribuyente de la planta; tanto en el proceso germinativo, vivero y primeros meses después de plantada (CONABIO, 2008; Teixeira *et al.*, 2007; Claridades

Agropecuarias, 1999). Actualmente, el cambio climático ha traído consigo un aumento en las temperaturas, salinidad de los suelos y un desabasto de agua en muchas partes del mundo que en conjunto, afectan el crecimiento de las plantas y la productividad de muchos cultivos comerciales entre ellos el de papaya, que a pesar de ser considerado un cultivo relativamente tolerante al déficit hídrico, puede presentar malformaciones en el fruto, aborto floral y por ende bajas en su producción de hasta un 50% (SENASICA, 2012; Hewezi *et al.*, 2008).

La reciente secuenciación del genoma completo de *Carica papaya* var. SunUp, ofrece una herramienta en la identificación de genes que participen en la respuesta a un estrés abiótico (Ming *et al.*, 2008). Los factores de transcripción son proteínas que actúan como reguladores en la transcripción de genes, por lo que son candidatos para ser utilizados en la regulación génica que permita a la planta desarrollarse bajo un estrés abiótico ocasionado por altas temperaturas o un déficit hídrico (Century *et al.*, 2008). A la fecha, se han descrito un gran número de factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana* y otras plantas, entre ellos destaca la familia AP2/ERF, presente en plantas de diferentes taxa filogenéticos. La principal característica de este grupo es su habilidad de activarse bajo señales de estrés, tanto biótico y abiótico, promoviendo la expresión de distintos genes, incluyendo los que tienen que ver con la respuesta a sequía, frío o salinidad (Wang *et al.*, 2012; Xin Shi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011; Kannangara *et al.*, 2007; Aharoni *et al.*, 2004).

La importancia de este trabajo radicó en caracterizar y comparar la respuesta fisiológica de dos genotipos de *C. papaya* L. ante un estrés por déficit hídrico, evaluando además la cantidad de ceras totales presentes en las hojas como una respuesta al estrés. Por otra parte se caracterizó la estructura, filogenia y expresión de la familia completa de los genes *SHINE* en *C. papaya* L., con el objetivo de evaluar y comparar los patrones de expresión y determinar su posible función en condiciones de estrés abiótico. Los resultados obtenidos, nos proporcionan información valiosa sobre la respuesta fisiológica que tiene la planta de papaya ante un estrés por déficit hídrico y genera conocimiento referente a posibles elementos involucrados en el mecanismo de respuesta de la planta hacia este tipo de estrés, al mismo tiempo que abre una ventana de oportunidades para la posible obtención de una planta modificada genéticamente a partir de genes evaluados en relación a cambios en sus patrones de expresión génica en respuesta al estrés aplicado.

I.2. ANTECEDENTES GENERALES

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

Carica papaya L. es una planta conocida a nivel mundial tanto por sus beneficios nutricionales como sus aplicaciones medicinales (Ming *et al.*, 2008). Se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, debido en parte a la viabilidad de sus semillas (SENASICA, 2012). Aunque no se tiene evidencia arqueológica que indique su lugar exacto de origen, muchos autores coinciden en que *C. papaya* L. es originaria del Sur de México y/o Centro América (Badillo, 1971). Es cultivada en forma comercial no sólo en las regiones de América, sino también en África, Asia, Australia, Filipinas y en los Estados Unidos (SENASICA, 2012). En México, 21 estados siembran y cosechan papaya, sin embargo, ocho son considerados los más importantes por su producción, éstos son: Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Colima, Michoacán, Yucatán y Jalisco; siendo Oaxaca el principal productor reportado para el año 2013 (SIAP, 2014).

I.2.2. Clasificación taxonómica

La papaya es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia Caricaceae. Esta familia está formada por 6 géneros y 35 especies (Ming y Moore, 2014). De acuerdo a Badillo (2000), los géneros correspondientes a esta familia son: *Carica* (1 especie), *Jarilla* (3 especies), *Horovitzia* (1 especie), *Jacaratia* (7 especies), *Vasconcellea* (21 especies) y *Cylicomorpha* (2 especies). En el Cuadro I.1, se presenta la clasificación taxonómica para papaya de acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2014).

Cuadro I.1. Clasificación taxonómica de *Carica papaya* L.

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

I.2.3. Descripción morfológica

La papaya es una planta arborescente perennifolia, puede crecer de 1.8 a 3 m durante su primer año de vida y alcanzar una altura de 10 m (CONABIO, 2008; Morton, 1987). Con un olor acre característico, es una especie de desarrollo precoz, ya que puede iniciar su producción a los 7 u 8 meses de edad y estabilizar su cosecha a los 12 meses después de plantada (Rodríguez *et al.*, 2002). Su período de vida va de 3 a 15 años aunque se han reportado plantas que producen hasta los 20 años. Un fruto de papaya bien polinizado produce entre 300 y 700 semillas esféricas y cubiertas por una capa mucilagínosa parda negruzca y arrugada (Figura I.1) (CONABIO, 2008).



Figura I.1. Corte longitudinal de un fruto de *Carica papaya* L. Maradol. Se observa la presencia de las semillas en el interior (Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular, 2013).

Las plantas de papaya poseen un sistema radical pivotante, su raíz principal se ramifica en forma radial alcanzando hasta 1.5 m de profundidad dependiendo de las condiciones del suelo; mientras que sus raíces secundarias se encuentran distribuidas en los primeros 30 cm. El tallo es cilíndrico y hueco excepto en los nudos, es más grueso en la base y presenta un crecimiento monopódico cuando joven y al madurar puede ramificarse (CABI, 2013; CONABIO, 2008). Su corteza es lisa de un color verde grisáceo, puede presentar cicatrices semicirculares que dejan las hojas al caer. Las hojas son de pecíolos largos y huecos de color verde, morado o una combinación de ambos; la lámina foliar es grande, gruesa de forma palmeada, hendida y palminervia. El haz es de color verde oscuro lampiño; el envés es más claro y en él se observan las nervaduras protuberantes. Las hojas aparecen en forma alterna a lo largo del tallo y bajo condiciones óptimas de crecimiento puede producir 2 hojas por semana (Figura I.2) (SENASICA, 2012; CONABIO 2008).

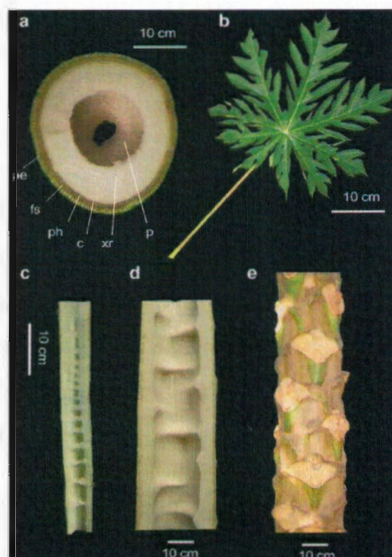


Figura 1.2. Partes vegetativas de un ejemplar de *Carica papaya* L. (a) Sección transversal del tallo de una planta adulta. (b) Lámina foliar y peciolo. (c) Sección longitudinal del tallo en planta joven. (d) Sección longitudinal del tallo en planta adulta. (e) Tallo de planta adulta que muestra las cicatrices conspicuas que dejan los peciolos al caer (Jiménez *et al.*, 2014).

1.2.3.1. Características de la Flor

Las flores de papaya nacen en la axila de cada hoja, cuando alcanzan la madurez son blancas, tienen cinco pétalos, de corola carnosa, carecen de néctar y son ligeramente perfumadas (Van Wyk, 2005). Para las plantas de papaya existe un comportamiento muy característico con sus flores, ya que es una especie polígama, lo que da lugar a plantas pistiladas (femeninas), estaminadas (masculinas) o pistiloestaminadas (hermafroditas), (Rodríguez *et al.*, 2002; Arango *et al.*, 2000;).

1.2.3.2. Características de los Frutos

En la planta de papaya, los frutos se encuentran apiñados alrededor del tronco. Son bayas elipsoides a esféricas, que miden entre 22 a 27 cm de largo y de 9 a 13 cm de ancho (Arango *et al.*, 2000). La fruta presenta una maduración lenta, pulpa suave de gran consistencia. Al madurar el fruto, la epidermis es gruesa con una coloración amarillo-naranja y la pulpa rojo salmón. Para las frutas hermafroditas, la pulpa y cáscara son muy

firmes lo que hace a la fruta resistente al transporte y le ayuda a prolongar su vida de anaquel (SENASICA, 2012).

I.2.4. Requerimientos climáticos

La papaya es una planta tropical que puede cultivarse a partir del nivel del mar hasta los 1000 msnm, obteniéndose los mayores rendimientos a altitudes por debajo de los 800 msnm. En la actualidad, el cultivo de papaya se extiende desde el Ecuador hasta los 32° de latitud norte y sur (CONABIO, 2008). Sin embargo, ciertos factores naturales influyen de manera decisiva en el desarrollo de este cultivo, un ejemplo, son las características que el suelo necesita para que el cultivo se produzca de manera exitosa (SENASICA, 2012).

I.2.4.1. Temperaturas

La temperatura es un factor climático limitante que permite o impide el desarrollo del fruto. El rango de temperatura oscila entre los 21 y 33 °C, siendo la óptima entre los 23 y 27 °C (SAGARPA, 2005; Nakasone y Paull, 1998). Las bajas temperatura retardan o inhiben el crecimiento e incluso pueden matar a una planta adulta cuando es expuesta a temperaturas por debajo de los 0 °C. En regiones cálidas su crecimiento es más rápido y los frutos son de mejor calidad comparados a las regiones frías; no obstante, temperaturas mayores a 35 °C provocan abscisión floral, quemaduras en las hojas y bajas en la producción (AGOGTR, 2008). Las plantas hermafroditas, por su parte, son muy susceptibles a cambios de clima que pueden provocar deformación en las flores o impedir un desarrollo completo (SAGARPA, 2005; Arango *et al.*, 2000).

I.2.4.2. Luz

Debido a su gran actividad fotosintética que permite la acumulación de biomasa, las plantas de papaya necesitan abundante luz (Richards, 2000). Es imposible desarrollar plantaciones con restricciones de luz, pues las plantas serían alargadas y amarillas; sintomatología asociada a un bajo contenido de nutrientes, lo que trae como consecuencia un inadecuado desarrollo de las plantas (Jiménez, 2002).

I.2.4.3. Suelo

Las plantas de papaya se desarrollan en diferentes tipos de suelo siempre que sean fértiles, blandos, profundos y permeables. De hecho, la permeabilidad del suelo es uno de los factores más importantes a considerar al establecer un cultivo de papaya, ya que un drenaje insuficiente puede provocar pudriciones radicales por la afección de patógenos del suelo, causando el amarillamiento de las hojas, pérdida de vigor e incluso la muerte de la planta. Por otra parte, suelos compactados dificultan el crecimiento de la planta al reducir el volumen de exploración radial (Arango *et al.*, 2000; Krochmal, 1978). Para el cultivo de este frutal se prefieren suelos franco arenosos profundos, con un contenido medio de 4 a 5% de materia orgánica y con un buen drenaje tanto superficial como interno. El pH óptimo se encuentra entre los límites neutrales a ligeramente ácidos (pH 6 a 7) (SENASICA, 2012; CONABIO, 2008; Arango *et al.*, 2000).

I.2.4.4. Humedad

El riego es esencial para mantener el crecimiento constante de la planta, el número de hojas y la maduración del fruto (Queensland, 2012, SENASICA, 2012). En una planta de papaya, el agua constituye alrededor del 85% del peso del fruto y una falta de ella durante su crecimiento puede ocasionar caída de flores, producción de flores hermafroditas estériles reduciendo los rendimientos hasta en un 50%. Aunque la cantidad de agua requerida por la planta depende de varios factores como la edad, temperatura, luz, viento y tipo de suelo, varios autores coinciden en que una cantidad de 1000 a 2000 mm bien distribuidos durante el año son suficientes para su desarrollo (CONABIO, 2008; Yee *et al.*, 1980).

I.2.5. Importancia económica de Papaya en México

El valor social de este importante cultivo es algo que debe ser mencionado, ya que es fuente de trabajo en los países productores durante la temporada de cosecha, que en algunos lugares puede llegar a una cosecha a la semana durante año y medio (Ming y Moore, 2014). México, se ha mantenido como el principal exportador de papaya a nivel mundial en los últimos seis años, en el 2011 se registraron ventas anuales superiores a los 46 millones de dólares, siendo Estados Unidos el mayor consumidor con 84% del mercado total (FAOSTAT, 2014). La producción de esta fruta en 2011, generó una

derrama económica importante de 580 millones de dólares y la generación de 68 mil empleos directos. A nivel nacional hay más de 7 000 productores que cultivan y cosechan papaya en 8 estados (SIAP, 2014). Recientemente, se ha registrado que el cultivo tuvo mayor crecimiento en las zonas costeras de México (Figura I.3) (SENASICA, 2012; Comisión Veracruzana de Comercio Agropecuario, 2010; SAGARPA, 2010).

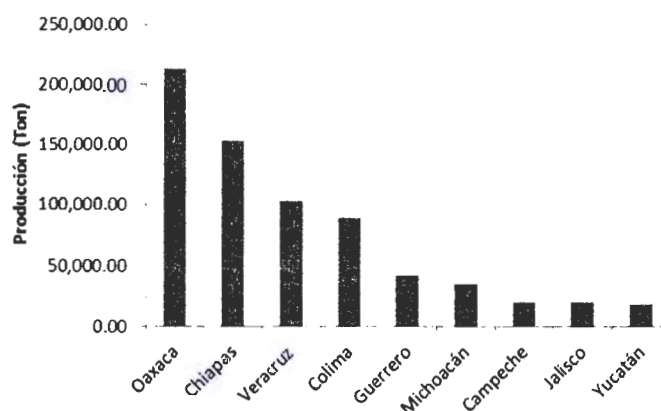


Figura I.3. Principales estados productores de Papaya en México. Producción agrícola para 2013, Riego + Temporal (SIAP, 2014).

El género *Carica* es considerado nativo de América Tropical, en México se cultivan diferentes variedades que han sido nombradas tomando como base criterios como: apariencia, forma, tamaño y procedencia de la fruta (SAGARPA, 2005). Así tenemos material criollo como: Cera, Coco y Mamey; variedades comerciales denominadas: Maradol, Solo, Tainung I y II, Amarilla; y cultivares hawaianos como: Red Lady y Cari. Actualmente en México, el cultivar comercial más importante es Maradol, que ha destacado por su sabor y valores nutritivos, además debido a la gran aceptación que se tiene por el consumidor y la rentabilidad que ofrece al productor, ha ido desplazando paulatinamente del mercado a las variedades criollas, las cuales presentaban mayor diversidad que las poblaciones domesticadas en las áreas de Centro América correspondientes a Honduras, Veracruz y Yucatán (Gobierno del estado de Yucatán, 2012; SENASICA, 2012; Paull *et al.*, 2008).

1.2.5.1. Producción de Papaya

En los últimos años, la producción mundial de papaya se ha concentrado en cinco países: India, Brasil, Indonesia, Nigeria y México con 40.4, 17.8, 7.7, 7.6 y 7.0 Mt respectivamente (Figura 1.4). Respecto a los principales exportadores a nivel mundial, en 2011 México ocupó el primer lugar con 104,000 t que representó el 57% de la exportación total a nivel mundial (FAOSTAT, 2014).

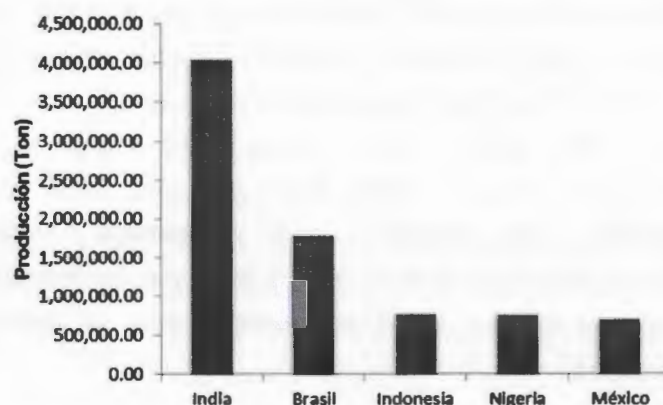


Figura 1.4. Principales países productores de Papaya a nivel mundial. Promedio 2007-2011 (FAOSTAT, 2014).

En la última década, el consumo de papaya ha cobrado mayor importancia, debido al interés creciente de los consumidores en las propiedades antioxidantes del fruto, el contenido de pro-vitamina A, minerales y fibra, lo que ha propiciado la expansión de su producción (Evans y Ballen, 2012). La superficie de papaya cultivada en el mundo en 1996 fue de 288 568 ha con una producción de 4 536 718 t. Para el 2006, la superficie cultivada fue de 391 073 ha con 6 590 141 t, lo que representa un incremento del 35 y 45% respectivamente. A nivel nacional, en el período de 2007 a 2012 se sembraron en promedio 21 836 ha en tierras de riego y temporal, con una producción de 707 201 t, (FAOSTAT, 2014; SENASICA, 2012).

1.2.5.2. Producción de Papaya en Yucatán

Hasta hace algunos años, en el estado de Yucatán la papaya era considerada un cultivo tradicional, con un área plantada de casi 150 ha de papaya criolla antes de 1995, casi todas manejadas como cultivos secundarios. Su producción tenía como objetivo los

mercados locales y algunos centros turísticos, por lo que no se utilizaban tecnologías avanzadas. El programa de papaya Maradol en Yucatán nace a finales de 1995 considerando los antecedentes de la introducción de este genotipo en los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero (Gobierno del estado de Yucatán, 1999).

Actualmente, la producción de papaya en el estado de Yucatán ha sido considerada prioritaria en virtud del acelerado crecimiento que ha experimentado en los últimos años, por su rentabilidad y por la generación de empleos. La mayor cantidad de la producción yucateca de papaya se vende al mercado nacional (75%), al consumo estatal se destina un 10% y el otro 15% de la producción se exporta como en producto fresco, siendo los principales destinos Mac Allen y Miami (Gobierno del estado de Yucatán, 2012; Santamaría *et al.*, 2011). Aunque el estado de Yucatán pasó de ser el sexto al décimo productor de papaya a nivel nacional en 2013, la superficie y producción del fruto crecieron aproximadamente tres veces de 2000 a 2004 y se ha mantenido en 55 000 t anuales, convirtiéndose en uno de los principales cultivos del estado (SIAP, 2013; Santamaría *et al.*, 2011).

I.2.6. Déficit hídrico en la producción de Papaya

En el medio ambiente el estrés por déficit hídrico y salinidad limitan considerablemente la producción agrícola; se ha estimado que ambos tipos de estrés ocasionan una disminución en el rendimiento de los cultivos de hasta un 70% comparándolo con el obtenido bajo condiciones favorables (Boyer, 1982). De hecho, la sequía es considerada como un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente en zonas semiáridas y es un problema recurrente que aqueja a los cultivos a nivel mundial. El estrés por déficit hídrico conlleva a una reducción en la absorción de nutrientes y transporte de los mismos desde la raíz hasta las hojas, una disminución en la transpiración y un cambio en la permeabilidad de la membrana para reducir la pérdida de agua lo que inevitablemente se traduce a una menor producción (Taiz y Zeiger, 2006; Bota *et al.*, 2004).

Para el caso específico de papaya, se ha reportado que su productividad se ve afectada por enfermedades que atacan al follaje, raíz y frutos (Heine *et al.*, 1965). Sin embargo, también existen factores abióticos que afectan de manera considerable su producción.

Para la planta de papaya, el agua es fundamental durante todo su crecimiento y desarrollo, ya que constituye el 85% del volumen del fruto y un exceso o insuficiencia del líquido puede ocasionar efectos contraproducentes en la planta (Claridades Agropecuarias, 1999).

En las últimas décadas, la influencia de las actividades antropocéntricas han provocado la fluctuación del clima, lo que ha conllevado a problemas ambientales y socioeconómicos (Hare, 2003). Uno de ellos, es la disponibilidad de agua, que ha disminuido sobre todo en los países de zonas áridas, debido al incremento de la población mundial que se calcula será de 8.9 miles de millones para el 2030; y al aumento en la demanda del líquido en países que buscan un desarrollo económico y social (Cosgrove y Rijsberman, 2000). Lo anterior ha propiciado un aumento en la extracción de agua a tal punto que se calcula que la presión sobre los recursos hídricos crecerá significativamente en más del 60% en el mundo, incluyendo las zonas de África, Asia, y América Latina (Alcamo *et al.*, 1998). En México, el fenómeno de sequía ha sido el más frecuente entre los eventos meteorológicos de los últimos seis años, y de acuerdo a las proyecciones de North American Drought Monitor (2014), el porcentaje de áreas afectadas con sequía irá en aumento (Figura 1.5) (Claridades Agropecuarias, 2011).

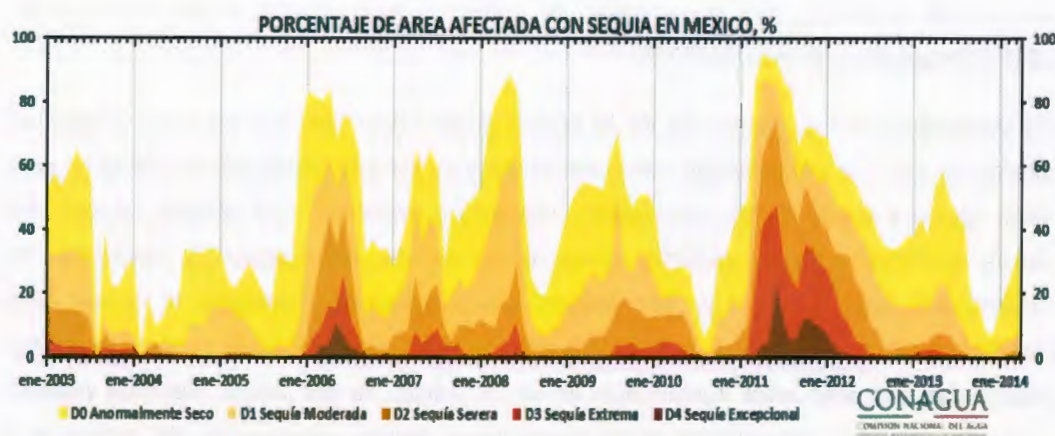


Figura 1.5. Porcentaje de área afectada con una o varias categorías de sequía en México (CONAGUA, 2014).

La comparación entre los promedios de precipitación anual y estacional del periodo 1980-1999 y los promedios de precipitación proyectados a cien años (periodo 2080-2099)

indican una disminución de la precipitación anual para toda la región de Centro América. Para la península de Yucatán, las proyecciones reportan una reducción en la precipitación pluvial anual del 10 al 15% (Bárcena *et al.*, 2010). Además, Magrin *et al.*, (2007), reportaron que para la zona Maya (Belice, Campeche, Chiapas, El Salvador, Guatemala, Honduras, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán) se espera un incremento en la temperatura promedio de 2 a 3.5 °C para el 2090, así como una reducción en la precipitación anual del 10 al 22% para ese mismo periodo. Esta disminución en las lluvias podría provocar el aumento de períodos intensos de sequía, afectación en las actividades agropecuarias con una consecuente reducción en la producción de los cultivos (Márdero *et al.*, 2012; Galindo, 2007).

1.2.7. Factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico

Diferentes tipos de estrés abiótico, como el déficit hídrico, salinidad, temperaturas extremas, toxicidad y estrés oxidativo amenazan seriamente la agricultura y al medio ambiente en general, debido a los efectos negativos que tienen en el crecimiento y producción de las plantas (Mizoi *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1999). Bajo condiciones de estrés, las plantas han desarrollado sistemas complejos que les permiten percibir señales del exterior y responder apropiadamente mediante cambios fisiológicos y bioquímicos regulados por la expresión de genes de respuesta al estrés (Mizoi *et al.*, 2012; Yamaguchi y Shinozaki, 2006).

La complejidad en la respuesta de la planta a un estrés abiótico se debe a que los diferentes tipos de estrés están interconectados y al ser percibidos por la planta causan daño celular y estrés de tipo secundario (osmótico y oxidativo). Las señales iniciales del estrés primario activan corriente abajo procesos de señalización y controles de transcripción los cuales a su vez activan mecanismos de respuesta al estrés para reestablecer la homeostasis, proteger y reparar los daños en proteínas y membranas. De esta forma una respuesta inadecuada en uno o varios de los pasos descritos pueden ocasionar cambios irreversibles en la homeostasis celular, destrucción de proteínas y membranas provocando la muerte de la célula (Figura 1.6) (Zhu, 2002; Knight y Knight 2001; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000).

La transcripción, quizás sea uno de los pasos cruciales, ya que permite la activación de genes de respuesta al estrés, los diferentes genes se han agrupado en tres categorías: (i) los que están involucrados en las cascadas de señalización y en el control transcripcional como MyC, MAP kinasas y SOS kinasas, fosolipasas y Factores de Transcripción (FTs); (ii) los que están implicados directamente en la protección de membranas y proteínas, como las heat-shock proteins (Hsps), chaperonas y osmoprotectores; y (iii) aquellos involucrados en la toma y transporte de iones y agua, como los transportadores iónicos y las acuaporinas (Wang *et al.*, 2003).



Figura I.6. Respuesta de la planta al estrés abiótico (adaptado de Ambika *et al.*, 2008).

Los factores de transcripción (FTs), son proteínas implicadas en los procesos de regulación del desarrollo, diferenciación y crecimiento celular y al estar involucradas en la activación y/o represión de la transcripción de los genes son los principales reguladores de la expresión genética (Paez-Rendondo y Sauer, 1992). Los FTs juegan un papel central regulando la expresión de los genes corriente abajo como elementos *trans-acting* de unión específica a elementos *cis-acting* en la región promotora del gen. En base al análisis de los promotores de respuesta a estrés, se ha visto que los elementos *cis* y *trans* están involucrados en las respuestas transcripcionales al estrés (Mizoi *et al.*, 2012; Yamaguchi y Shinozaki, 1994). En *Arabidopsis thaliana* cerca del 5.9% de su genoma codifica a más de 1,500 FTs (Riechmann *et al.*, 2000), lo que revela la complejidad de la

regulación de genes a nivel transcripcional. De acuerdo a lo reportado en la literatura son varios los factores de transcripción asociados al estrés por déficit hídrico, en particular, los pertenecientes a la familia AP2/ERF han recibido mayor atención porque se ha visto pueden responder a más de un estrés (Cuadro I.2) (Nakashima *et al.*, 2009).

Cuadro I.2. Factores de transcripción miembros de la súper familia AP2/ERF asociados a diferentes tipos de estrés.

Clasificación	Gen	Especie	Estrés abiótico	Autor
DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Oh S., <i>et al.</i> , 2005
	DREB1A/CBF3	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Sakuma <i>et al.</i> , 2004
			Sequía, Salinidad,	
	DREB1	<i>A. thaliana</i>	Heladas	Kasegwa <i>et al.</i> , 1999
	DREB1B/CBF1	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Novillo <i>et al.</i> , 2004
	ZmDREB1A	<i>Z. mays</i>	Sequía	Qin <i>et al.</i> , 2004
	DREB1A/CBF3	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Pelgrineschi <i>et al.</i> , 2004
AP2/ERF	WXP1	<i>M. truncatula</i>	Sequía	Zhang <i>et al.</i> , 2005
	DREB2	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Sakuma <i>et al.</i> , 2006
			Sequía	
	ERF3	<i>N. tabacum</i>	Salinidad	Zhang <i>et al.</i> , 2009
			Sequía	
	AP37	<i>O. sativa</i>	Salinidad	Oh <i>et al.</i> , 2009
			Sequía, salinidad,	
	AtCBF3	<i>O. sativa</i>	bajas temperaturas	Oh <i>et al.</i> , 2005
	NFYA5	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Li <i>et al.</i> , 2009
	SHN1/WIN1	<i>A. thaliana</i>	Sequía	Aharoni <i>et al.</i> , 2004

La súper familia AP2/ERF está codificada por 145 loci en *A. thaliana* y 167 en *O. sativa*. De acuerdo a lo reportado por Paull *et al.*, (2008), en papaya existen 92 genes potenciales para ERF. Hasta hace poco se consideraba a las proteínas que contienen el dominio AP2 exclusivas de plantas; sin embargo, Magnani *et al.*, (2004), encontraron secuencias homólogas al dominio AP2/ERF en la cianobacteria *Trichodesmium erythraeum*, en el ciliado *Tetrahymena thermophila* así como en los virus Enterobacteria fago Rb49 y el Bacteriofago Felix 01; lo que ha dado origen a la hipótesis de que dicho dominio se originó

a partir de proteínas endonucleasas con el dominio HNH presentes en bacterias y virus que fueron transferidas durante la endosimbiosis de las cianobacterias para formar los cloroplastos o bien por infecciones virales o algún otro evento de transferencia horizontal que fueron cambiando la actividad de las endonucleasas hasta transformarlas eventualmente en la súper familia de factores de transcripción AP2/ERF y en las diferentes familias que contienen dicho dominio (Mizoi *et al.*, 2012; Shigyo *et al.*, 2006; Magnani *et al.*, 2004).

El dominio AP2/ERF contiene de 60-70 aminoácidos con una estructura terciaria única involucrada en la unión de ADN. Fue identificado por primera vez en una proteína AP2 en *Arabidopsis thaliana* (Jofuku *et al.*, 1994) y después en proteínas de unión con un elemento de respuesta a etileno (EREBP) de *Nicotiana tabaccum* (Ohme y Shinshi, 1995). En 1998 Allen *et al.*, describieron la estructura tridimensional del dominio AP2/ERF que consta de tres hojas β anti-paralelas en la región amino terminal y una hélice α en el extremo carboxilo terminal (Figura I.7) (Sharma *et al.*, 2010). Se ha visto que los FTs de la familia ERF se unen al ADN a través de los residuos de Triptófano (W) y Arginina (R) localizados en las estructuras β -plegadas del dominio AP2/ERF a través de los puentes de hidrógeno que se originan entre los aminoácidos con el esqueleto y bases del ADN (Allen *et al.*, 1998; Hao *et al.*, 1998).

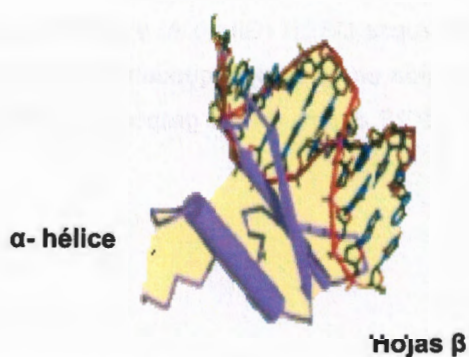


Figura I.7. Estructura tridimensional del dominio AP2/ERF en *Arabidopsis thaliana* (Allen *et al.*, 1998).

Los miembros de la familia AP2/ERF pueden dividirse en tres grupos basándose solamente en su estructura. Miembros de la subfamilia AP2 (14 miembros en *A. thaliana*) contienen un dominio doble AP2/ERF; miembros de la subfamilia RAV (6 miembros) contienen un dominio AP2/ERF y un dominio de unión B3 al ADN adicional; mientras que el grupo de los “otros” (125 miembros) contienen solamente un dominio AP2/ERF. A su vez, la subfamilia AP2 en las plantas con semillas pueden clasificarse dentro del grupo AP2 y el grupo ANT (Sharma *et al.*, 2010). Por otra parte, Sakuma *et al.*, (2002), analizaron las relaciones filogenéticas de los 125 miembros con un sólo dominio AP2/ERF en *Arabidopsis* basados en su similitud y los clasificó en tres grupos: la subfamilia DREB (56 miembros; grupo A), subfamilia ERF (65 miembros, grupo B) y los otros (4 miembros). Las subfamilias DREB y ERF fueron divididas a su vez en 6 subgrupos: A-1 a A-6 y B-1 a B-6, respectivamente (Mizoi *et al.*, 2012).

Una clasificación más detallada y completa de las proteínas que contienen un solo dominio AP2/ERF en la familia ERF fue realizado por Nakano *et al.*, (2006), quienes reportaron el análisis filogenético tomando en cuenta no sólo las diferencias en el dominio de unión al ADN, sino también consideraron la presencia de intrones y exones; así como el análisis de diferentes motivos estructurales presentes en las proteínas. Estos resultados son similares a la clasificación realizada por Sakuma *et al.*, (2002), de tal forma, se organizaron tres familias y un gen aislado sin clasificación: AP2 (18 genes), RAV (6 genes), el gen Atg13040; los grupos DREB (Grupo A) y ERF (Grupo B) quedaron dentro de una sola familia (ERF) dividida en 10 clados, quedando el grupo DREB dentro de los grupos I,II,III y IV; y el grupo ERF dentro de los grupos V,VI,VII,VIII,IX y X (Figura 1.8) (Nakano *et al.*, 2006).

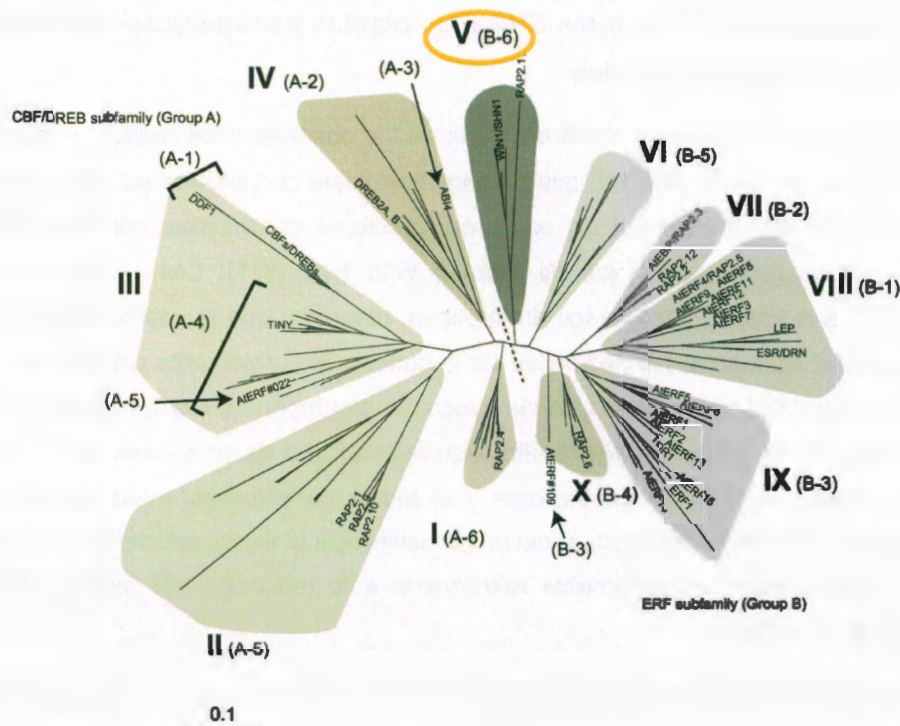


Figura I.8. Árbol filogenético de las proteínas ERF reportadas para *Arabidopsis thaliana* (Nakano *et al.*, 2006). La clasificación propuesta por Sakuma *et al.*, (2002) está indicada en paréntesis.

Recientemente se ha visto que el clado *SHINE* (grupo V) confiere tolerancia al estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*. En el 2004, Aharoni *et al.*, y Broun *et al.*, identificaron y caracterizaron el clado *SHINE* que regula la expresión de un número de genes involucrados en la biosíntesis de ceras. La sobreexpresión de *SHN1* (*SHN1/WIN1*) en *A. thaliana* aumentó la acumulación de ceras epicuticulares, redujo el índice estomático y alteró la permeabilidad de la cutícula lo que confirió a la planta una mayor tolerancia a un déficit hídrico y permitió su recuperación en condiciones favorables. Estudios posteriores realizados por Kumiawan (2005), revelaron que algunos genes relacionados al estrés como RD22 y LEA también son regulados por *SHN1* en las plantas mutantes de *A. thaliana* con el gen sobre-expresado.

1.2.8. Sobreexpresión de genes *SHINE* en plantas transgénicas y su efecto en la tolerancia al estrés abiótico

Los genes *SHINE* reciben su nombre a partir de las observaciones realizadas en plantas mutantes del gen en *A. thaliana*, que presentaban hojas con superficies más brillantes y un incremento en la cantidad de ceras epicuticulares constituidas principalmente por alcanos, comparadas con hojas de plantas Wild type (WT). Los estudios sobre el contenido de clorofila y peso fresco de la planta, revelaron que la sobreexpresión de los genes *SHINE* alteraba la permeabilidad de la cutícula probablemente por cambios en su ultra estructura. Del mismo modo, con la ayuda del gen reportero GUS, observaron que la sobreexpresión de los genes *SHINE* alteraban la estructura de las células epidérmicas de hojas y pétalos, el número de tricomas y el índice de estomas. Interesantemente, la sobreexpresión de *SHINE* condujo a una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico y una exitosa recuperación probablemente relacionada a la reducción del índice estomático (Aharoni *et al.*, 2004).

Las proteínas SHINE (SHN), son miembros de la súper familia de los FTs AP2/ERF que participan tanto en el desarrollo vegetal, floral o como mediadores en la respuesta de la planta a varios tipos de estrés ambiental (Singh *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1998; Riechmann y Meyerowitz, 1998; Okamura *et al.*, 1997). Diferentes miembros de la familia de AP2/ERF pueden regular genes involucrados en respuesta a frío, sequía, etileno y jasmonatos. Estas cascadas de señalización pueden llevarse a cabo directamente por una regulación de las rutas metabólicas, lo que conlleva a la producción de metabolitos esenciales para la supervivencia de las plantas (Aharoni *et al.*, 2004).

En este sentido, es posible que los miembros del clado *SHINE* actúen de manera combinada para proteger las capas internas y externas de la planta de factores medioambientales. Tres características comunes del clado indican que estos miembros están relacionados en su función; la primera, es la gran similitud de estas tres secuencias, en su dominio AP2 altamente conservado, la segunda es la presencia del motivo completo "mm" presente solamente en *SHN1/WIN1*, *SHN2* y *SHN3* de *A. thaliana* y de otras dos proteínas reportadas para *O. sativa* y *S. lycopersicum* (*OsSHN1*, *OsSHN2* y *SISHINE3* respectivamente). La presencia del motivo completo "mm" puede ser un factor común asociado a la función del clado *SHINE*, aunado a esta estructura genética bien

conservada entre estas tres proteínas, se incluyen dos exones y un solo intrón colocado a la misma distancia del codón de inicio ATG (Figura I.9). Finalmente, el mismo patrón obtenido al sobre-expresar alguna de las tres proteínas en otras especies como *S. lycopersicum* nos confirma la relación de estas tres proteínas en cuanto a su función (Xin Shi *et al.*, 2013; Shi Jian *et al.*, 2011).

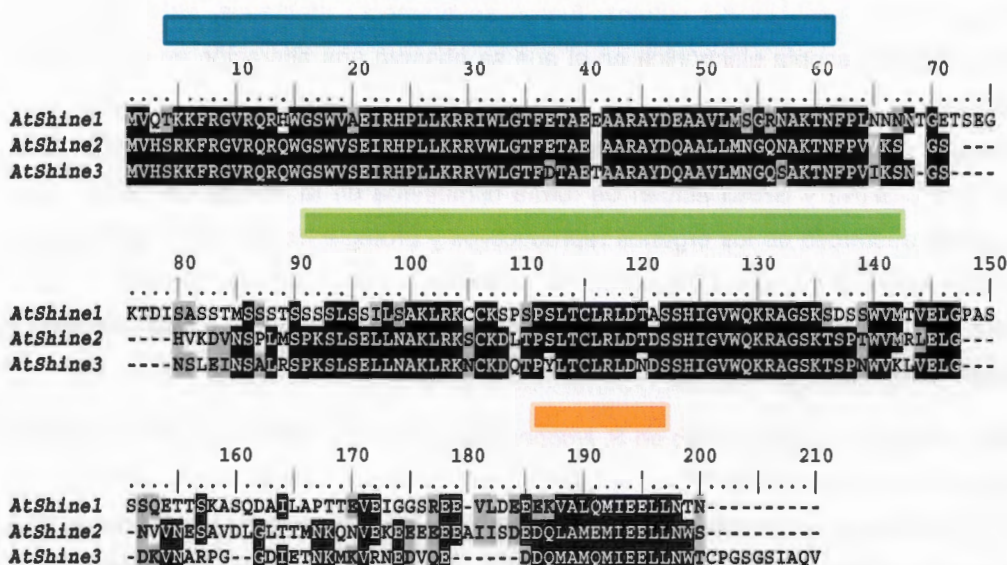


Figura I.9. Alineamiento de aminoácidos de tres proteínas *AtShine* de *Arabidopsis thaliana*. Las tres secuencias contienen un dominio AP2 en su región N-terminal, un motivo conservado "mm" y un motivo "cm" conservado. El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el gris claro corresponde a aminoácidos similares en un 50% (BioEdit, 2013).

Se ha visto que la sobre-expresión de los genes *SHINE* en *A. thaliana* ocasiona un incremento en la composición de ceras epicuticulares en hoja, alterando las propiedades de la epidermis, reduciendo la permeabilidad de la cutícula y el número de estomas, lo que confiere una tolerancia al déficit hídrico y una recuperación exitosa en condiciones de riego favorables, estas observaciones sugieren que los miembros de este clado regulan la expresión de un número de genes implicados en la biosíntesis de ceras. Un estudio subsecuente indicó que *SHN1/WIN1* controla la permeabilidad de la cutícula, regulando la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ceras, particularmente los genes

LACS2 (LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 2) (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Xin Shi *et al.* (2011), se corroboró la función de los genes *SHINE* en la biosíntesis de ceras en *A. thaliana* y además su participación en el desarrollo de los órganos florales al silenciar los genes *SHINE*. Ellos reportaron que al silenciarlos no se observaron cambios visuales durante el crecimiento vegetativo y la permeabilidad de la cutícula se mantuvo sin cambios; sin embargo, los órganos reproductivos en especial los pétalos, fueron severamente afectados, así lo reveló el análisis por microscopía electrónica en el que se observó una alteración en el arquetipo de las células epidérmicas, con lo que concluyeron que el clado actúa en la formación y morfología de las flores de *A. thaliana*. Los resultados obtenidos sugieren que *SHN1/WIN1*, *SHN2* y *SHN3* actúan de forma combinada en la elongación celular para asegurar el desarrollo de los órganos reproductivos y protegiendo las capas externas de un estrés ambiental. Además, el patrón de expresión varía en espacio y tiempo, lo que sugiere que cada gen juega un papel específico en cada órgano o bajo diferentes condiciones (Xin Shi *et al.*, 2011).

Finalmente otro estudio realizado en *S. lycopersicum* L. por Xin Shi *et al.*, (2013), reveló la participación del cisgen *S/SHN3* en la formación de la cutícula en los frutos carnosos del tomate. En este estudio analizaron plantas con el gen sobre expresado y otras con el gen silenciado para comparar la composición de las ceras en la cutícula, concluyendo que esta proteína juega un papel importante en el control de la formación de la cutícula en las células de la epidermis y en la regulación del patrón de las células durante el desarrollo del fruto, ya que las plantas con el gen silenciado presentaron alteraciones morfológicas en la epidermis del fruto y una reducción en la cantidad de lípidos presentes en la cutícula (Xin Shi *et al.*, 2013).

1.2.9. Genes *SHINE* involucrados en la tolerancia a estrés abiótico

Los genes *SHINE* se encuentran involucrados en la formación de ceras cuticulares, desarrollo de órganos florales y se expresan en respuesta al estrés abiótico reduciendo el número de estomas. En el Cuadro 1.3 se describen cuáles son los genes homólogos a los descritos en *A. thaliana* reportados en otras especies vegetales.

Cuadro I.3. Revisión de la literatura de genes *SHINE* reportados en la biosíntesis de ceras cuticulares en diferentes especies.

Artículo	Gen	Autor	Año
The <i>SHINE</i> Clade of AP2 Domain Transcription Factors activates wax biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and confers drought tolerance when overexpressed in <i>Arabidopsis</i>	SHN/ W1N	Aharoni <i>et al.</i> ,	2004
WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in <i>Arabidopsis</i>	WIN	Broun <i>et al.</i> ,	2004
The transcription Factor WIN1/SHN1 regulates Cutin Biosynthesis in <i>Arabidopsis thaliana</i>	WIN1/ SHN1	Kannangara <i>et al.</i> ,	2007
Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in <i>Arabidopsis</i> by change in development of stomata	WIN1/ SHIN	Yang <i>et al.</i> ,	2011
<i>SHINE</i> Transcription Factors act redundantly to Pattern the archetypal surface of <i>Arabidopsis</i> Flower Organs	SHN1/ WIN1	Xin Shi <i>et al.</i> ,	2011
An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice	OsWR1	Wang <i>et al.</i> ,	2012
The tomato <i>SISHINE3</i> transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning	SISHN3	Xin Shi <i>et al.</i> ,	2013
MIXTA-Like Transcription Factors and WAX <i>INDUCER1/SHINE1</i> Coordinately Regulate Cuticle Development in <i>Arabidopsis</i> and <i>Torenia foemieri</i>	WAX <i>INDUCER1/ SHN1</i>	Oshima <i>et al.</i> ,	2013

En base a lo presentado en este capítulo se sugiere que los genes tipo *SHINE* participan en la biosíntesis de ceras totales, lo que puede conferir tolerancia al estrés por déficit hídrico, por lo que en este estudio se propuso caracterizar *in silico* genes homólogos a los reportados en *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* L. var SunUp y evaluar la expresión de estos genes en respuesta al estrés por déficit hídrico, además de caracterizar la respuesta fisiológica que acompañan a este tipo de estrés en una especie tropical como lo es papaya, debido a la importancia económica que tiene este cultivo en nuestro país.

I.3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

I.3.1. Preguntas de Investigación

- ¿Existen homólogos a los genes tipo *SHINE* reportados para *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* var. SunUp?
- ¿Qué efecto tiene el estrés por déficit hídrico sobre la fisiología de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, y cuál es su capacidad de recuperarse ante dicho estrés?
- ¿Qué efecto tiene el estrés por déficit hídrico en la composición y cantidad de ceras totales presentes en los folíolos de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tiempos de exposición?
- ¿Qué efecto tiene el estrés por déficit hídrico en la expresión de los genes tipo *SHINE* en dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre?

I.3.2. Hipótesis

Los genes *SHINE* participan en la biosíntesis de ceras epicuticulares en *Arabidopsis thaliana* confiriendo tolerancia a estrés por déficit hídrico; por lo tanto, es probable que existan genes homólogos a los factores transcripcionales de la familia AP2/ERF tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya*, que estén involucrados en la tolerancia al estrés abiótico por déficit hídrico.

I.4. OBJETIVOS

I.4.1. Objetivo General

- Caracterizar la estructura, filogenia y expresión de los genes *SHINE* de *Carica papaya* L., Maradol y Silvestre; y evaluar el efecto sobre la fisiología en plantas jóvenes de papaya expuestas a condiciones de estrés abiótico por déficit hídrico.

I.4.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la estructura y filogenia de la familia completa de genes homólogos tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* L. var. SunUp.
- Caracterizar fisiológicamente la respuesta de dos genotipos Maradol y Silvestre de *C. papaya* a un estrés por déficit hídrico y en recuperación.
- Evaluar los perfiles de ceras totales presentes en dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre en respuesta al estrés por déficit hídrico y en recuperación.
- Evaluar la expresión basal de homólogos de genes *SHINE* y la expresión en respuesta al estrés por déficit hídrico y en recuperación de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de tesis se divide en cuatro etapas. Se inició con el análisis bioinformático para aislar *in silico* los genes de interés y se diseñaron los juegos de oligonucleótidos específicos cada uno (Capítulo II). Para el análisis fisiológico y cuantificación de ceras totales (Capítulo III y IV) se partió con la colecta de frutos de los genotipos Maradol y Silvestre para germinar las semillas y generar el material de análisis necesario. Con el material vegetal obtenido de cada uno de los tratamientos, se procedió a evaluar los cambios en el patrón de expresión de los genes seleccionados en respuesta a estrés por déficit hídrico y en recuperación (Capítulo V) (Figura I.10).

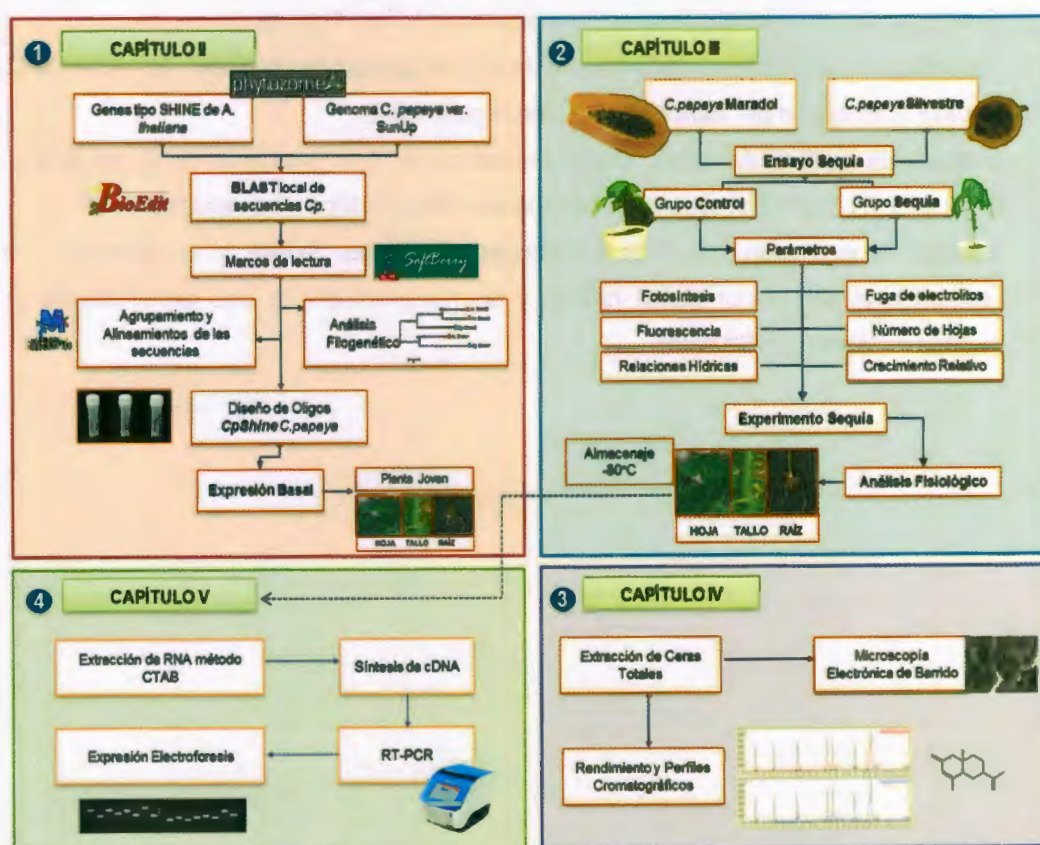


Figura I.10. Metodología general de la tesis "Caracterización y análisis de expresión en respuesta a estrés por déficit hídrico, de genes homólogos tipo SHINE en papaya (*Carica papaya* L.)".

I.6. BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel y A. Pereira (2004). The *SHINE* clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**. 2463-2480.
- Alcamo, J., G.J.J. Kreileman, J.C. Bollen, G.J. van den Born, R. Gerlagh, M.S. Krol, A.M.C. Toet y H.J.M. De Vries (1998). Baseline scenarios of global environmental change. En: *Global Change Scenarios of the 21st Century, Results from the IMAGE 2.1 Model*. J. Alcamo, R. Leemans, E. Kreileman (eds.), Elsevier Science, Kidlington, Oxford, pp. 97-139.
- Allen, M.D., K. Yamasaki, M. Ohme-Takagi, M. Tateno y M. Suzuki (1998). A novel model of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.*, **17**:5484-5496.
- Ambika, S., S.M. Varghese, K. Shameer, M. Udayakumar y R. Sowdhamini (2008). STIF: Hidden Markov Model-based search algorithm for the recognition of binding sites of Stress-upregulated Transcription Factors and genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformation*, **2**(10):431-437.
- Arango, W., L.V. Roman, H.C.A. Salamanca, C.R. Almansa, M.E.F. Bernal, R.J.H. León M.G.A. Rey, V.V.E. Ariza, y N.M. Gómez (2000). El cultivo de la papaya en los llanos orientales de Colombia. Manual de Asistencia Técnica. CORPOICA., **4**:13-26.
- Australian Government Office of the Gene Technology Regulator (2008). The Biology of *Carica papaya* L. (papaya, papaw, paw paw). Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator.
- Badillo, V.M. (1971) Monografía de la familia *Caricaceae*. Publicado por la Asociación de profesores. Universidad Central de Venezuela, Maracay.
- Bárcena, A., A. Prado, H. Beteta, J.L. Samaniego y J. Lennox (2010). La economía del Cambio Climático en Centroamérica, Síntesis 2010, Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).

- Bota, J., M. Hipólito y J. Flexas (2004). Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress?. *New Phytol.*, **162**:671-681.
- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- CAB International (2013). *Carica papaya* L. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK. CAB International [on line] Disponible en: <http://www.cabi.org/cpc> [Acceso 20 noviembre de 2013].
- Century, K., T. Lynne-Reuber y O. Ratcliffe (2008). Regulating the Regulators: The future Prospects for Transcription-Factor-Based Agricultural Biotechnology Products. *Plant Physiol.*, **147**:20-29.
- Claridades Agropecuarias (1999). Papaya un Mercado en expansión. Claridades agropecuarias. México. Marzo. pp 3-24.
- Claridades Agropecuarias (2011). Mecanismos de atención a la problemática de la sequía. Claridades agropecuarias. México. Octubre. pp 3-17.
- Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria (2010). Monografía de la papaya. Gobierno del Estado de Veracruz. [on line] Disponible en: <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAFIA%20PAPAYA2010.PDF> [Acceso 20 Noviembre 2013].
- CONABIO (2008). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. [on line] (Actualizado 19 diciembre 2008). Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/indice_especies.html. [Acceso 07 Noviembre 2013].
- CONAGUA (2010) Sequía: Seguimiento Mensual de Afectación por sequía. [on line] (Actualizado 15 octubre 2014) Disponible en: http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=236&Itemid=23 [Acceso 20 noviembre 2013].

- Cosgrove, W.J. y F.R. Rijsberman (2000). *World Water Vision: Making Water Everybody's Business*. London: Earthscan Publications.
- Evans, E.A. y F.H. Ballen (2012). *An Overview of Global papaya production, trade, and consumption*. University of Florida: IFAS Extension. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu>. [Acceso 20 noviembre 2013].
- FAO (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Origen y distribución de *Carica papaya* L. Disponible en: www.fao.org.
- FAOSTAT (2014) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Estadísticas de la *C. papaya* L. Disponible en: <http://faostat.fao.org>.
- Galindo, L.M. (2007). *Economía del Cambio Climático en México*, Informe Galindo, Síntesis, Gobierno Federal, SEMARNAT, México.
- Gobierno del Estado de Yucatán (1999). *Seminario de papaya Maradol*. Mérida, Yucatán. pp. 1-5.
- Gobierno del Estado de Yucatán (2012). *Plan Rector del Sistema Producto Papaya*. Mérida, Yucatán. pp. 1-50.
- Gutterson, N. y T.L. Reuber (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:465-471.
- Hao, D., M. Ohme-Takagi y A. Sarai (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J. Biol. Chem.*, 273:26857-26861.
- Hare, W.L. (2003). Assessment of knowledge on impacts of Climate Change: Contribution to the Specification of Art. 2 of the UNFCCC: impacts of ecosystems, food production, water and socio-economic systems" Disponible en http://www.wbgu.de/wbgu_sn2003_ex01.pdf.
- Heine, R.B., O.V. Holtzmann y R.D. Raabe (1965). Diseases of papayas (*Carica papaya* L.) in Hawaii. *Hawaii Agric. Expt. Stn. Bull.*, 136:1-26.

- Hewezi, T., M. Léger y L. Gentzbittel (2008). A comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Genes Expression in Sunflower. *Ann. Bot.*, **102**:127-140.
- ITIS (2014). Sistema Integrado de Información Taxonómica. *Carica papaya* L. Caricaceae Taxonomic Serial No. 22324. [on line] (Actualizado 08 marzo 2013) Disponible en: <http://www.itis.gov/>.
- Jiménez, D.J.A. (2002). Manual práctico para el cultivo de la papaya Hawaiana. CR: EARTH. 21-23.
- Jiménez, V.M., E. Mora y M.V. Gutiérrez-Soto (2014). Biology of the Papaya Plant. En: *Genetics and Genomics of Papaya*. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. (10), Springer, New York. 18 pp.
- Jofuku, K.D., B.G. den Boer, M. Van Montagu y J.K. Okamuro (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, **6**:1211–1225.
- Kannangara, R., C. Branigan, Y. Liu, T. Penfield, V. Rao, G. Mouille, H. Höfte, P. Herman, R. Markus y J.L. Broun Pierre (2007). The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**:1278-1294.
- Knight, H. y M.R. Knight (2001). Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends. Plant. Sci.*, **6**:262–267.
- Krochmal, A. (1978). Algunas enfermedades de la papaya. *La Hacienda*, **3**:50-53.
- Kurniawan, R. (2005). Comparative Analysis of Drought resistance genes in *Arabidopsis* and rice. Tesis de Doctorado. Universidad de Wageningen, Países Bajos. pp. 41-51.
- Lee, H., L. Xiong, M. Ishitani, B. Stevenson y J.K. Zhu (1999). Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Plant J.*, **17**:301–308.
- Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, S.K. Yamaguchi y K. Shinozaki (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an ERFEBP/AP2 DNA binding

- domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**: 1391–1406.
- Magnani, E., K. Sjolander y S. Hake (2004). From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell*, **16**:2265–2277.
- Magrin, G.O., M.L. Travasso, M.O. Grondona y G.R. Rodríguez (2007). Variabilidad climática, cambio climático y sector agropecuario, s/d.
- Mahouachi, J., A.R. Socorro y M. Talon (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil*, **281**:137-146.
- Márdero, S., E. Nickl, B. Schmook, L. Schneider, J. Rogan, Z. Christman y D. Lawrence (2012). Sequías en el sur de la Península de Yucatán: análisis de la variabilidad anual y estacional de la precipitación. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*, **78**:19-33.
- Marler, T.E. y M.V. Mickelbart (1998). Drought, leaf gas exchange, and chlorophyll florescence of field-grown papaya. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **123**(4):714–718.
- Ming, R. y P.H. Moore (2014). *Genetics and Genomics of Papaya*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* (10), Springer, New York. pp. 9.
- Ming,R., S. Hou, Y.Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J.H. Saw, P. Senin, W. Wang, B.V. Ly, K.L.T. Lewis, S.L. Salzberg, L. Feng, M.R. Jones, R.L. Skelton, J.E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R.E. Paull, T.P. Michael, K. Wall, D.W. Rice, H. Albert, M.L. Wang, Y.J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R.A. Acob, P. Guan, A. Blas, C.M. Wai, C.M. Ackerman, Y.Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J.K. Na, E.V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J.E. Bowers, A.R. Gschwend, A.L. Delcher, R. Singh, J.Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M.J. Torres, F. Alex Feltus, B. Porter, Y. Li, A.M. Burroughs, M.C. Luo, L. Liu, D.A. Christopher, S.M. Mount, P.H. Moore, T.

- Sugimura, J. Jiang, M.A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D.E. Shippen, C.W. de Pamphilis, J.D. Palmer, M. Freeling, A.H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang y M. Alam. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, **452**: 991-997.
- Mizoi, J., K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**:86-96.
- Morton, J. (1987). Papaya. En: *Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL: 336–346.
- Muñozcano, M. y C.O. Martínez (2008). Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa, A.C. pp.1-13.
- Nakano, T., K. Zuki, T. Fujimura y H. Shinshi (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.*, **140**:411–432.
- Nakashima, K., Y. Ito y K. Yamaguchi-Shinozaki (2009). Transcriptional regulatory network in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol.*, **149**:88-95.
- Nakasone, H.Y. y R.E. Paull (1998). Papaya, en: *Tropical fruits. Crop production science in horticulture N°7*. CAB International Publication (ed), Wallingford UK, pp. 239-269.
- North American Drought Monitor (2014) National Climate Data Center. (Actualizado 31 de Julio de 2014) Disponible en: <http://www.ncdc.noaa.gov/nadm.html> [Acceso 10 septiembre 2014].
- Ohme-Takagi, M. y H. Shinshi (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, **7**:173–182.
- Okamuro, J.K., B. Caster, R. Villarreal, M.V. Montagu, y K.D. Jofuku (1997). The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**:7076–7081.

- Paez-Redondo, A. y R. Sauer (1992). Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**:1953-1095.
- Paull, R.E., B. Irikura, P. Wu, H. Turano, C. Jung, A. Blass, J.K. Fellman, A.R. Gschwend, C. Man Wai, Q. Yu, G. Presting, M. Alam y R. Ming (2008). Fruit development, ripening and quality related genes in the Papaya genome. *Tropical Plant Bio.*, **1**:246-277.
- Queensland Government. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (2012). Papaya land and climate requirements. [on line] (Actualizado 20 septiembre 2012) Disponible en: <http://www.daff.qld.gov.au/plants/fruit-and-vegetables/fruit-and-nuts/papaya/papaya-land-requirements> [Acceso 08-09-2014].
- Richards, R.A. (2000). Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.*, **51**:447-458.
- Riechmann, J.L. y E.M. Meyerowitz (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem.*, **379**:633-646.
- Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O.J. Ratcliffe, R.R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J.Z. Zhang, D. Ghandehari, B.K. Sherman, y G. Yu (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**:2105-2110.
- Rodríguez, N.A., C.F. Jiménez y M.G. Sánchez (2002). Producción Económica de papaya Maradol. Fundación Produce Puebla. ITA. INIFAT. pp. 113.
- SAGARPA (2005). Plan Rector Sistema Nacional Papaya. Segunda fase: diagnóstico inicial base de referencia estructura estratégica. Disponible en: www.inforural.com.mx.
- SAGARPA (2010) Papaya mexicana. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/PapayaMexicana.aspx>. Fecha de revisión: 15-marzo-2013.

- Sakuma, Y., Q. Liu, J.G. Dubouzet, H. Abe, K. Shinozaki y K. Yamaguchi-Shinozaki (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**:998–1009.
- Santamaria, B.; P. Díaz, A. Gutiérrez, J. Santamaría, A. Larqué (2011). Control of two species of *Colletotrichum* causing anthracnose in Maradol papaya fruits. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, **(2)5**:631-643.
- SENASICA (2012) Servicio Nacional de sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Información técnica de semilla de papaya mexicana para exportación a la República Bolivariana de Venezuela. Disponible en: www.senasica.gob.mx.
- Sharma, M.K., R. Kumar, A.U. Solanke y R. Sharma (2010). Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Mol. Genet. Genomics*, **284**:455-475.
- Shi, J.X.; S. Malitsky, S. De Oliveira, C. Branigan, B. Franke, L. Schreiber y A. Aharoni (2011). *SHINE* transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of Arabidopsis flower organs. *PLoS Genetics*, **7(5)**: 1-16.
- Shigyo, M., M. Hasebe y M. Ito (2006). Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene*, **366**: 256–265.
- Shinozaki, K. y K. Yamaguchi-Shinozaki (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **3**:217–223.
- SIAP (2014) Servicio de Información agroalimentaria y pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. Disponible en: www.siap.gob.mx.
- Singh, K., R.C. Foley y L. Onate-Sanchez (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**:430–436.
- Taiz, L. y E. Zeiger (2006). *Plant Physiol.*, Sinauer Associates, Inc. Four Edition. pp. 670-705.

- Teixeira, J.A, Z. Rashid, D. Tan Nhut, D. Sivakumar, A. Gera, S.M. Teixeira y P.F. Tennant (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. Tree For. Sci. Biotech., 1(1): 47-73.
- Van, W.B. (2005). *Carica papaya*. Food Plants of the World: An Illustrated Guide. Portland, OR: Timber Press. p. 118.
- Wang, W., B. Vinocur y A. Altman (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218:1-14.
- Wang, Y., L. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, R. Quan, S. Zhou y R. Huang (2012). An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes. Plant Mol. Biol., 78:275-288.
- Xin Shi, J., A. Adato, N. Alkan, Y. He, J. Lashbrooke, A.J. Matas, S. Meir, S. Malitsky, T. Isaacson, D. Prusky, D. Leshkowitz, L. Schreiber, A.R. Granell, E. Widemann, B. Grausem, F. Pinot, J.K.C. Rose, I. Rogachev, C. Rothan y A. Aharoni (2013). The tomato *SISHINE3* transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. New Phytol., 197:468-480.
- Xin Shi, J., S. Malitsky, S. De Oliveira, C. Branigan, R.B. Franke, L. Schreiber y A. Aharoni (2011). *SHINE* Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. PLoS Genet., 7(5):371-388.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. Plant Cell, 6:251-64.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. Plant Biol., 57: 781-803.
- Yang, J., M.I. Ordiz, J.G. Jaworski y R.N. Beachy (2011). Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata. Plant Physiol. Biochem., 49: 1448-1455.

- Yee, W., T.T. Sekioka, H.Y. Nakasone, O.K. Ikehara y J.J. Ooka (1980). Evaluation of papaya line and cultural practices of Moloua. Island of Kauai, Hawaii. Circular College of Tropical Agriculture and Human Resource, University of Hawaii, **497**: 20-21.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**:247–73.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN *in silico*, ESTRUCTURA Y FILOGENIA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN EL GENOMA SECUENCIADO DE PAPAYA TRANSGÉNICA (*Carica papaya* L.) VAR. SUNUP

II.1. INTRODUCCIÓN

Carica papaya es uno de los frutales de mayor importancia económica a nivel mundial y debido a sus propiedades nutraceuticas es cultivada de forma comercial en las regiones tropicales y subtropicales de los cinco continentes; sin embargo, el 50% de su producción se concentra en el continente Americano (FAOSTAT, 2012; FAO, 2008). A pesar de que el cultivo de papaya es de rápido crecimiento y tiempo de vida relativamente corto, su productividad se ve afectada por múltiples tipos de estrés biótico y abiótico, un ejemplo, es el estrés por déficit hídrico. En condiciones normales la planta de papaya requiere cerca de 22 L de agua diarios durante la etapa de fructificación y ante una falta de riego la tasa de producción disminuye lo que conlleva al aumento en los costos de producción (Muñozcano y Martínez, 2008). Por lo tanto, obtener un cultivo tolerante a los cambios ambientales es uno de los grandes retos para el mejoramiento genético basado en la biotecnología moderna (Kurniawan, 2005; Dubouzet *et al.*, 2003).

El uso de la planta modelo de *Arabidopsis thaliana* ofrece una oportunidad para el análisis de genes corriente abajo involucrados en la respuesta al estrés a nivel fisiológico y bioquímico en la mayoría de las plantas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). A pesar de que las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas divergieron hace 200 miles de millones de años lo que ha afectado la conservación del orden de genes en los cromosomas, todavía se pueden observar similitudes a nivel de secuencias y funcionalidad de proteínas (Gale y Devos, 1998; Wolfe *et al.*, 1989). Hace 72 millones de años *C. papaya* y *A. thaliana* compartieron un ancestro en común, actualmente *C. papaya* presenta una reducción promedio en el número de genes de un 20% aproximadamente. Es una planta con un genoma pequeño de 372 Mb, en comparación a *Oryza sativa* (466 Mb) y *Solanum lycopersicum* (900 Mb); es diploide ($2n=18$) con nueve pares de

cromosomas, un sistema bien establecido de propagación, corto tiempo de generación (9 a 15 meses) y una floración continua durante todo el año (Ming *et al.*, 2008). Aunado a ello, *C. papaya* se ha convertido en un modelo de estudio biotecnológico para otros frutales, ya que es la única fruta tropical de la que se han desarrollado variedades transgénicas como la resistente al virus de la mancha anular (PRSV), mismas que han sido aceptadas y comercializadas de manera exitosa (Gonsalves, 1998).

A la fecha se ha reportado un gran número de genes que responden al estrés por déficit hídrico en *A. thaliana* y están clasificados en dos grupos: los que participan en la protección celular durante el estrés y los que regulan a otros genes corriente abajo implicados en la respuesta al estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Kasuga *et al.*, 1999; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). El primer grupo incluye a las proteínas involucradas en el ajuste osmótico, la reparación, la desintoxicación y adaptaciones estructurales por parte de la planta. El segundo grupo, está formado por proteínas reguladoras, tales como las proteínas quinasas y factores de transcripción (FTs). El uso de la ingeniería genética a nivel de FTs es una estrategia prometedora para la obtención de cultivos tolerantes al estrés por déficit hídrico, pues se encuentran involucrados en la regulación de una gama de genes diana cuyos productos contribuyen a la tolerancia del estrés evaluado (Kurniawan, 2005).

Los FTs correspondientes a la familia APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) están conservativamente dispersos en el reino vegetal. Se encuentran involucrados en el control del metabolismo primario y secundario, crecimiento, desarrollo y en las respuestas a los estímulos ambientales. Debido a la plasticidad y especificidad de los miembros de ésta familia representan un objetivo valioso para la ingeniería genética (Haake *et al.*, 2002; Kasuga *et al.*, 1999; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998).

II.1.1. Familia de Factores de Transcripción AP2/ERF

La familia AP2/ERF comprende uno de los grupos más grandes de factores de transcripción en el reino vegetal, por ejemplo, el genoma de *Solanum lycopersicum* presenta al menos 85 genes que codifican para la familia de proteínas ERF, la mayoría de ellos aún sin caracterizar (Sharma *et al.*, 2010; Riechmann *et al.*, 2000). Los miembros de esta súper familia de FTs poseen al menos un dominio de unión al ADN, APETALA2 (AP2)/ERF y como monómero reconoce a la caja "GCC" o a los elementos de unión al

ADN CRT/DRE *cis-acting* (Yang *et al.*, 2009; Allen *et al.*, 1998; Hao *et al.*, 1998). El dominio AP2 consiste en 3 hojas β -anti paralelas y una hélice- α . En el complejo ADN-FT, se ha visto que los residuos de Triptófano (W) y Arginina (R) presentes en las hojas β , participan en la unión con el ADN (Sharma *et al.*, 2010). A la fecha, se han distinguido dos regiones en el dominio AP2/ERF: la región YRG (20 aa de largo), rica en residuos de naturaleza básica y se ha propuesto que tiene un rol en la unión al ADN debido a su carácter básico (Okamuro *et al.*, 1997). Y la región RAYD (40 aa de largo) que contiene 18 aa capaces de formar una hélice- α alifática lo que puede tener un rol importante en la estructura y función del dominio (Okamuro *et al.*, 1997; Jofuku *et al.*, 1994). De acuerdo a la clasificación realizada por Nakano *et al.*, (2006), los miembros de ésta familia pueden dividirse en cuatro grupos en función al dominio AP2: Subfamilia ERF (122 miembros en *A. thaliana*), Subfamilia AP2 (18 miembros en *A. thaliana*), Subfamilia RAV (6 miembros en *A. thaliana*) y finalmente el gen aislado Atg13040 (Sharma *et al.*, 2010) (Figura II.1).

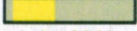
Clasificación	N°	Grupo
 Familia ERF	57	Grupo I a IV
	58	Grupo V a X ← 
	7	Grupo VI-L a Xb-L
 Familia AP2	14	Doble dominio AP2/ERF
	4	Único dominio AP2/ERF
 Familia RAV	6	
 At4g13040	1	

Figura II.1. División de la familia AP2/ERF de acuerdo a la estructura del dominio AP2 (adaptado de Nakano *et al.*, 2006). Se señala la ubicación de los genes *SHINE* en base a ésta clasificación.

Éstas proteínas regulan diversos procesos biológicos incluidos el crecimiento, desarrollo y fisiología de la planta, como la actividad del meristemo, abscisión de los órganos florales, metabolismo de lípidos, biosíntesis de alcaloides y respuestas a un estrés ambiental (temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidad y ataque de patógenos) (Nakano *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2011; Gutterson y Reuber, 2004). A la fecha, se ha demostrado que

muchos miembros de esta familia regulan también genes relacionados a la biosíntesis de la cutícula (Hen-Avivi *et al.*, 2014).

II.1.2. Familia AP2/ERF en respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico

Las plantas responden a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico a nivel fisiológico, bioquímico y molecular. Muchos autores señalan que la regulación génica a nivel transcripcional es uno de los principales puntos de control en los procesos biológicos y los FTs juegan un papel clave en estos procesos al inducir la expresión o represión de genes con diferentes funciones (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Los elementos de unión responsivos de unión al etileno (ERFs) pertenecen a una súper familia de factores de transcripción específicos para las plantas con 147 miembros en *A. thaliana* (Nakano *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2003). Los ERFs influyen en diferentes procesos de desarrollo y también son importantes para la adaptación al estrés de tipo biótico y abiótico (O'Donnell *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1996; Ecker, 1995). Por lo que es crucial estudiar la función de estos genes para incrementar el rendimiento de los cultivos expuestos a diferentes tipos de estrés.

Los ERFs se unen a la caja consenso, típicamente referida como motivo "GCC", a través de un dominio de unión al ADN altamente conservado denominado AP2 (Hao *et al.*, 1998; Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). Se ha visto que muchos de los miembros de ésta familia regulan genes relacionados a la biosíntesis de la cutícula, por ejemplo, el gen *Glossy15* identificado en maíz (*Zea mays* L.) regula la identidad de las células epidérmicas de la hoja (Moose y Sisco, 1996; Evans *et al.*, 1994; Moose y Sisco, 1994). En *Arabidopsis thaliana*, el miembro de la familia SHINE: *SHN1/WIN1* fue el primero en ser reconocido por su rol en la ruta de biosíntesis de ceras en hojas (Kannangara *et al.*, 2007; Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). La sobreexpresión de *AtSHN1/WIN1* promueve la síntesis de la cutina y la rápida inducción de otros genes implicados en la ruta de biosíntesis de ceras (Xin Shi *et al.*, 2011; Kannangara *et al.*, 2007). La sobre expresión de *AtSHN1/WIN1* causó cambios significativos en la composición del monómero de cutina en los pétalos. Un estudio subsecuente indicó que *SHN1/WIN1* controla la permeabilidad de la cutícula regulando la expresión de genes implicados en la biosíntesis de la cutina, en específico del gen *LACS2* (LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 2) (Kannangara *et al.*, 2007).

II.1.3. Genes *SHINE* en *Arabidopsis thaliana*

Una búsqueda en la homología de las secuencias y el análisis filogenético a través de la familia completa AP2/ERF mostraron que *SHN1/WIN1* es parte de un pequeño grupo de tres proteínas distintas, con 199, 189, y 186 residuos de aminoácidos de largo nombrados *SHN1/WIN1*, *SHN2*, y *SHN3*, respectivamente. Estas secuencias contienen el dominio AP2 altamente conservado y comparten otros dos motivos conservados en su parte N-terminal ("mm") y C-terminal ("cm"). Los dos motivos se encuentran completamente fuera del dominio AP2 y sólo están presentes en el clado *SHINE*, mientras que su próximo homólogo en *A. thaliana* (At5g25190) contiene sólo una parte del motivo "mm" y el motivo "cm". Las secuencias *SHN2* y *SHN3* presentan un mayor porcentaje de identidad entre las tres proteínas con un 71%, mientras que *SHN1* y *SHN2* presentan un 55%. Además, los miembros del clado *SHINE* conservan la estructura de los genes porque las tres secuencias contienen un solo intrón posicionado a 80 pb a partir del codón de inicio, lo que sugiere que las tres proteínas tienen un rol similar en *A. thaliana* (Aharoni *et al.*, 2004).

En 2004, Aharoni *et al.*, aislaron y caracterizaron una mutante del gen *SHINE* (*shn*) en *Arabidopsis* y observaron cambios estructurales en la superficie de las hojas en comparación con la Wild type (WT); las hojas de *shn* presentaron una marcada coloración verde brillante, con estructura rizada, cambios en la permeabilidad de la cutícula y en la cantidad total de cera cuticular, así como diferencias en la estructura epidérmica. Los resultados obtenidos por Aharoni sugieren que este clado actúa en la regulación de la ruta de biosíntesis de ceras requerida para la protección de las plantas hacia el medio ambiente y que además participa en la separación y formación de órganos florales (Xin Shi *et al.*, 2013).

La disponibilidad pública del genoma de *Carica papaya* var. SunUp, ha abierto la posibilidad de acelerar la identificación y caracterización de genes tipo ERF por medio de herramientas bioinformáticas para conseguir el mejoramiento genético de este cultivo mediante la manipulación genética de factores de transcripción. Por todo lo anterior, el objetivo de este capítulo fue identificar genes de *C. papaya* que presentaran homología al FT tipo ERF (*SHINE*), involucrado en regular la expresión de un número de genes corriente abajo confiriendo tolerancia tanto al estrés biótico como abiótico en un número

de plantas heterólogas (Zhang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Cheong *et al.*, 2003).

II.1.4. Long Acyl-CoA Synthetase en *Arabidopsis thaliana*

La cutícula es una capa lipolítica compuesta de cutina y ceras. La cutina es un polímero derivado de ácidos grasos, su biosíntesis consiste de una serie de reacciones que incluyen a la enzima acil-CoA sintetasa, que cataliza la conversión de un ácido graso libre a su forma activa: acil-CoA (Xue *et al.*, 2014; Lee y Suh, 2013; Kunst y Samuels, 2009; Nawrath, 2002). En 2002, Shockey *et al.*, reportaron la familia completa de genes *LACS* (Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase) implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, indicando que los *LACS* tienen una posición crucial en la ruta de biosíntesis de las moléculas derivadas de ácidos grasos al catalizar la formación de acil-CoA, intermediario en diferentes rutas metabólicas (Groot *et al.*, 1976). Los 9 miembros identificados en *A. thaliana* conservan ciertos motivos en sus secuencias, uno de ellos, es el llamado AMP binding protein (AMPBP), que está altamente conservado y actúa como dominio de unión al ADN (Babbitt *et al.*, 1992).

La actividad de los *LACS* ha sido localizada en diferentes sitios subcelulares, incluidos las envolturas externas del cloroplasto, cuerpos oleosos de semillas y en el retículo endoplasmático (ER) (Fulda *et al.*, 2002; Schnurr *et al.*, 2002; Shockey, *et al.*, 2002; Andrews y Keegstra, 1983). En las células epidérmicas de los tejidos aéreos de la planta, la actividad de los *LACS* es requerida para la activación de los ácidos grasos utilizados para la síntesis de cutina y ceras, que son los principales componentes de la cutícula (Schnurr *et al.*, 2002). De acuerdo a un análisis genómico realizado a través de los nueve miembros de la familia *LACS*, se encontró que *LACS2* es necesario para el correcto ensamblaje de las barreras cuticulares, por lo que es clave en la ruta de biosíntesis de las ceras (Schnurr *et al.*, 2004).

Estudios preliminares, encontraron expresión del gen *LACS2* en tallo, hoja, raíz y flores (Shockey *et al.*, 2002). Sin embargo, al estudiar la mutante (*lacs2*), se encontró que su expresión se encuentra limitada a la epidermis; el mutante *lacs2* presentó un fenotipo similar a los mutantes deficientes de cutina y ceras, excepto que no exhibieron fusión de los órganos florales u hojas. El contenido total de ceras en las hojas mutadas fue similar a

las WT, pero el espesor de la cutícula que cubría la parte abaxial se redujo en aproximadamente un 40%. Un trabajo publicado por Kannangara *et al.*, (2007) señaló que la regulación de los *LACS2* corriente arriba está dada por *WIN1/SHN1*, por lo tanto, en el presente trabajo se planteó realizar el aislamiento *in silico* de *LACS2* específico para *Carica papaya* var. SunUp y evaluar los cambios de expresión en respuesta a un estrés por déficit hídrico en dos genotipos de papaya.

II.2. HIPÓTESIS

Los genes tipo *SHINE* participan en el aumento de la tolerancia a estrés por déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*; por lo tanto, es probable que en *Carica papaya* var. SunUp existan genes homólogos a los genes *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*.

II.3. OBJETIVOS

II.3.1. Objetivo General

- Caracterizar la estructura y filogenia de la familia completa de genes homólogos tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* L. var. SunUp.

II.3.2. Objetivos Particulares

- Caracterizar *in silico* la estructura de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* L. var SunUp.
- Identificar los dominios conservados de los genes tipo *SHINE* de *Carica papaya* L. var SunUp.
- Realizar el análisis filogenético de las secuencias proteínicas de los genes tipo *SHINE* de *Carica papaya* L. var SunUp.

II.4. MATERIALES Y MÉTODOS

II.4.1. Aislamiento *in silico* de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*

La búsqueda de los genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* se realizó en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>); una vez encontradas las secuencias se procedió a realizar el aislamiento *in silico* de las mismas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* utilizando el programa TBLASTX (Zhang *et al.*, 2000), con los siguientes parámetros generales: 500 secuencias para mostrar con hits significativos; expect threshold 10, word size 3 y 0 para secuencia blanco (query). Además, se establecieron parámetros de puntuación utilizando la matriz de sustitución de bloques de aminoácidos BLOSUM62, con costos por la existencia de gaps de 11 y 1 por la ampliación de gaps. El aislamiento se realizó el día 19 de Abril del 2013.

II.4.2. Aislamiento *in silico* de genes tipo *CpShine* de *Carica papaya* L.

Para la búsqueda de genes *SHINE* homólogos en *Carica papaya* var. SunUp que pudieran estar implicados en la biosíntesis de ceras cuticulares confiriendo tolerancia a un estrés por déficit hídrico, se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit). Para el aislamiento *in silico* de las secuencias en *Carica papaya* L. que presentaran una homología con los genes *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* se realizó un Blast Local directamente con el genoma de papaya (Taxid: 3349) utilizando el programa TBLASTX (Zhang *et al.*, 2000); se utilizó como blanco (query) las secuencias de nucleótidos para los genes *SHINE* de *A. thaliana* bajados previamente de la base de datos del NCBI y TAIR. Los criterios generales utilizados para el alineamiento fueron los siguientes: 500 número máximo de hits para mostrar, 250 número máximo de alineamientos para mostrar, valor selectivo E (probabilidad de que el alineamiento con BLAST no haya ocurrido al azar) de 10. Aunado a lo anterior, se establecieron criterios de puntuación donde se utilizó la matriz de sustitución BLOSUM62.

II.4.3. Agrupamiento y selección de secuencias *CpShine* de *Carica papaya* L.

En base a los resultados obtenidos con el programa BioEdit (Hall, 1999), se agruparon y eligieron las secuencias que presentaran mayor porcentaje de identidad y similitud, utilizando el programa Blast Parser v1.2. (<http://geneproject.altervista.org/>). Las secuencias se eligieron en base a los siguientes criterios: secuencias codificantes con valores de $E \leq 10^{-14}$, secuencias con porcentajes de identidad y similitud superiores a 65% dentro del genoma de *Carica papaya* var. SunUp. Las secuencias obtenidas fueron traducidas a los seis marcos de lectura posibles utilizando un programa de algoritmos de predicción de genes FGENESH (<http://linux1.softberry.com/all.htm>). Las secuencias *SHINE* de *Carica papaya* L. fueron corroboradas dentro de la base de datos del programa bioestadístico de Phytozome (<http://www.phytozome.net>).

II.4.4. Predicción de los Marcos de Lectura Abiertos (ORF)

La predicción de los posibles marcos de lectura abiertos ORF (Open Reading Frame) de la secuencias nucleotídicas obtenidas a partir del análisis de BLAST, se determinaron utilizando el programa bioestadístico FGENESH (Solovyev *et al.*, 2006) utilizando el código genético de plantas dicotiledóneas (*Arabidopsis*). Con ayuda del programa TBLASTX (Zhang *et al.*, 2000) se predijeron los ORF de las secuencias obtenidas; las secuencias proteínicas predichas fueron editadas con el programa TRANSLATE (Swiss Institute of Bioinformatics) con el formato de salida que incluye la secuencia proteínica.

II.4.5. Alineamiento de secuencias proteínicas predichas e identificación de dominios conservados de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* var. SunUp

Para identificar los dominios conservados de los genes *SHINE* se realizó un alineamiento múltiple con todas las secuencias proteínicas de los genes tipo *SHINE* reportados para *Arabidopsis thaliana* (*AtShine1*, *AtShine2* y *AtShine3*) y las secuencias encontradas en *Carica papaya* (*CpShine1* y *CpShine2*) utilizando el programa MEGA 5.2. (Tamura *et al.*, 2011), mediante la herramienta CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1994).

II.4.6. Modelaje tridimensional de las proteínas *CpShine1* y *CpShine2*

Para observar si las secuencias de aminoácidos de *CpShine* presentaban una conformación tridimensional similar a la estructura típica del dominio AP2/ERF descrito por Allen *et al.*, (1998) se realizó un modelaje por homología de la estructura tridimensional de las secuencias *CpShine* encontradas en *C. papaya* var. SunUp, utilizando el programa Swiss Model (Arnold *et al.*, 2006). Dicho programa desarrolla una predicción del modelo tridimensional basándose en la homología encontrada por el alineamiento entre la secuencia sometida al programa y la base de datos del "Protein Data Bank", que contiene la estructura tridimensional de miles de proteínas que se han modelado por métodos experimentales de espectrofotometría o de resonancia magnética nuclear (Bordoli *et al.*, 2009). Para el modelaje de la proteína, se utilizaron los parámetros predeterminados por el programa.

II.4.7. Análisis filogenéticos de las secuencias de genes *AtShine* de *Arabidopsis thaliana* y *CpShine* de *Carica papaya*.

Para realizar el análisis filogenético se tomaron en cuenta las secuencias proteicas y nucleotídicas más probables, en base a las cuales se llevaron a cabo los alineamientos y se construyó un árbol filogenético para las secuencias de los genes *AtShine* de *Arabidopsis thaliana* y otro para las secuencias de *CpShine* de *Carica papaya*. Ambos árboles fueron contruidos con la ayuda del programa MEGA 5.2 utilizando el mejor modelo propuesto por el programa, se realizó una prueba de Bootstrap con 1000 réplicas, detección completa de Gap y datos perdidos y una contribución uniforme de los sitios.

II.4.8. Diseño de oligonucleótidos de genes *CpShine* de *Carica papaya*.

El diseño de los oligonucleótidos de los genes *CpShine* para el análisis de expresión por RT-PCR semi cuantitativo (Capítulo V) se realizó a partir de las secuencias homólogas de genes *CpShine* de papaya (*Carica papaya*) con los programas Primer Premier y Primer Express V2.0, utilizando los siguientes criterios de selección: los oligonucleótidos se diseñaron procurando tener una longitud no mayor a 22 pb, Tm mayor a 50 °C y un porcentaje de GC del 50%. Se buscó que el amplicón se encontrará en una zona divergente de la secuencia predicha y que atravesará al menos un intrón. Los oligonuceótidos fueron enviados a sintetizar a una casa comercial.

II.5. RESULTADOS

II.5.1. Identificación *in silico* de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*

Para poder estudiar mejor las respuestas a nivel molecular que intervienen en la tolerancia a un estrés por déficit hídrico se buscaron los números de accesoión para las secuencias de los genes *SHINE* en la base de datos del NCBI y TAIR (19 de Abril del 2013), encontrando un total de 3 miembros para la familia de los genes tipo *SHINE* en *Arabidopsis thaliana*. En el Cuadro II.1 se presentan los genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* y los Locus de la base de datos del NCBI.

Cuadro II.1. Secuencias tipo *SHINE* y locus en *Arabidopsis thaliana* obtenidas de la base de datos del NCBI.

GENES	LOCUS
<i>Shine (Arabidopsis thaliana)</i>	
SHN1 (WIN 1) <i>A. thaliana</i> ethylene-responsive transcription factor	NM_101405.3
SHN2 <i>A. thaliana</i> ethylene-responsive transcription factor	NM_121157.1
SHN3 <i>A. thaliana</i> ethylene-responsive transcription factor	NM_122448.3

II.5.2. Análisis filogenético de las secuencias de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*

El árbol filogenético que se presenta en la Figura II.2 muestra la relación existente entre las secuencias de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* involucrados en la biosíntesis de ceras cuticulares. En el árbol se distinguen dos grupos o clados, en los cuales, las secuencias de *AtShine2* y *AtShine3* están agrupadas dentro del mismo clado mientras que *AtShine1* se encuentra en otro. Entre las tres proteínas, *AtShine2* y *AtShine3* presentan un mayor porcentaje de identidad (71%), mientras que *AtShine1* y *AtShine2* tienen un 55% de identidad. Los dos grupos que componen al árbol filogenético están respaldados con valores de estimación de precisión (bootstrap) elevados.

La filogenia evolutiva de las secuencias de *AtShine* se dedujo utilizando el método de Maximum Likelihood basado en el Modelo General Reversible Chloroplast. La construcción del árbol consenso bootstrap se obtuvo a partir de 1000 réplicas que se

tomaron para repasar la historia evolutiva de los taxones analizados en las secuencias de *Arabidopsis thaliana*. El porcentaje de réplicas de árboles que se asocian con taxones agrupados se muestran a lado de las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo 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 máxima parsimonia fue utilizada, de lo contrario el método BIONJ con distancia de matriz MCL se hubiera utilizado. Una distribución gamma discreta se utilizó para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios (5 categorías (+G, el parámetro=0.3542)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medida en el número de sustituciones por sitio. Se analizaron 3 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 340 posiciones en el conjunto final de datos. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo utilizando en programa MEGA 5.2.

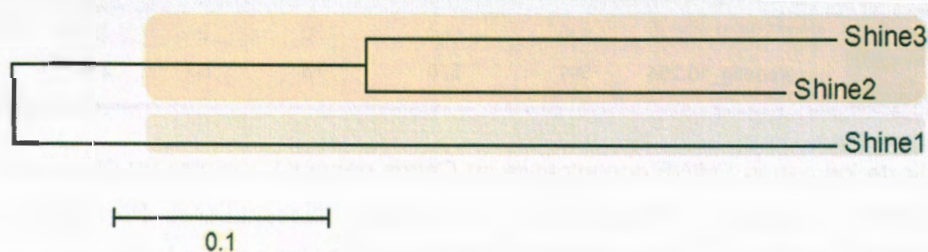


Figura II.2. Árbol filogenético en el que se observan las secuencias de genes *SHINE* presentes en *Arabidopsis thaliana*; donde *Shine2* y *Shine3* presentan un mayor porcentaje de identidad (71%), mientras que *Shine1* y *Shine2* tienen la menor identidad (55%) entre las tres proteínas.

II.5.3. Identificación *in silico* de genes tipo *SHINE* en *Carica papaya* L.

Para seleccionar las secuencias tipo *SHINE* en *C. papaya*, se utilizó el genoma secuenciado de *Carica papaya* var. SunUp y con el programa TBLASTX se encontraron las secuencias tipo *SHINE*. Las dos secuencias detectadas presentaron porcentajes de identidad del 70 y 73%, así como porcentajes de similitud del 83 y 94% y un valor esperado (E) de $5E^{-62}$ y $2E^{-58}$ respectivamente. Las secuencias encontradas en *C. papaya* var. SunUp fueron nombradas para este estudio como *CpShine1* y *CpShine2*, los parámetros de selección se encuentran descritos en el Cuadro II.2.

La reducción en el número de secuencias nucleotídicas *SHINE* homólogas del genoma de *C. papaya* L. var SunUp (2) en relación a *A. thaliana* (3) es consistente con lo observado en estudios previos realizados por el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular (Idrovo *et al.*, 2012) y concuerda con lo reportado por Ming *et al.*, (2008), en dónde se observó una reducción en el número de genes de aproximadamente 20% en comparación con *A. thaliana*. Los autores sugieren que la reducción en el número genes se debe a características clave necesarias para la evolución morfológica de papaya.

Cuadro II.2. Genes homólogos tipo *SHINE* de *Carica papaya* que presentaron porcentajes significativamente altos de identidad con respecto a los genes *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*.

GENES SHINE	Nombre de secuencia encontrada	Longitud Segmento (bp)	Longitud alineamiento (aa)	% de Identidad	% de Similitud	Valor (E)	Score
<i>CpShine1</i>	supercontig_259.2	838	660	70	94	5 E ⁻⁶²	62
<i>CpShine2</i>	supercontig_10.254	591	570	73	83	2 E ⁻⁵⁶	308

A partir de los genes *SHINE* encontrados en *Carica papaya* L. se hizo un Blast Local con el programa BioEdit y confirmado por el programa bioestadístico Phytozome, para comprobar que todos los genes *SHINE* homólogos de *Carica papaya* L. se agruparan con los miembros de la familia de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*.

II.5.4. Alineamiento de proteínas tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* y de *Carica papaya* var SunUp

En el alineamiento múltiple de las secuencias tipo *SHINE* de *A. thaliana* y *C. papaya* se observó que las secuencias proteínicas predichas en *C. papaya* var. SunUp presentaron dominios conservados, indicados en diferentes colores en la Figura II.3: en morado, se indica el dominio de unión al ADN (AP2), en verde el dominio N-terminal ("mm") y en naranja el dominio de activación C-terminal ("cm"). Se señalan con gráficos las regiones láminas- β y α -hélice presentes dentro del dominio AP2. Los asteriscos rojos, corresponden a los residuos de Triptófano (W) y Arginina (R) conservados en las secuencias, que permiten la unión entre el dominio de unión AP2 y el ADN (Allen *et al.*, 1998).

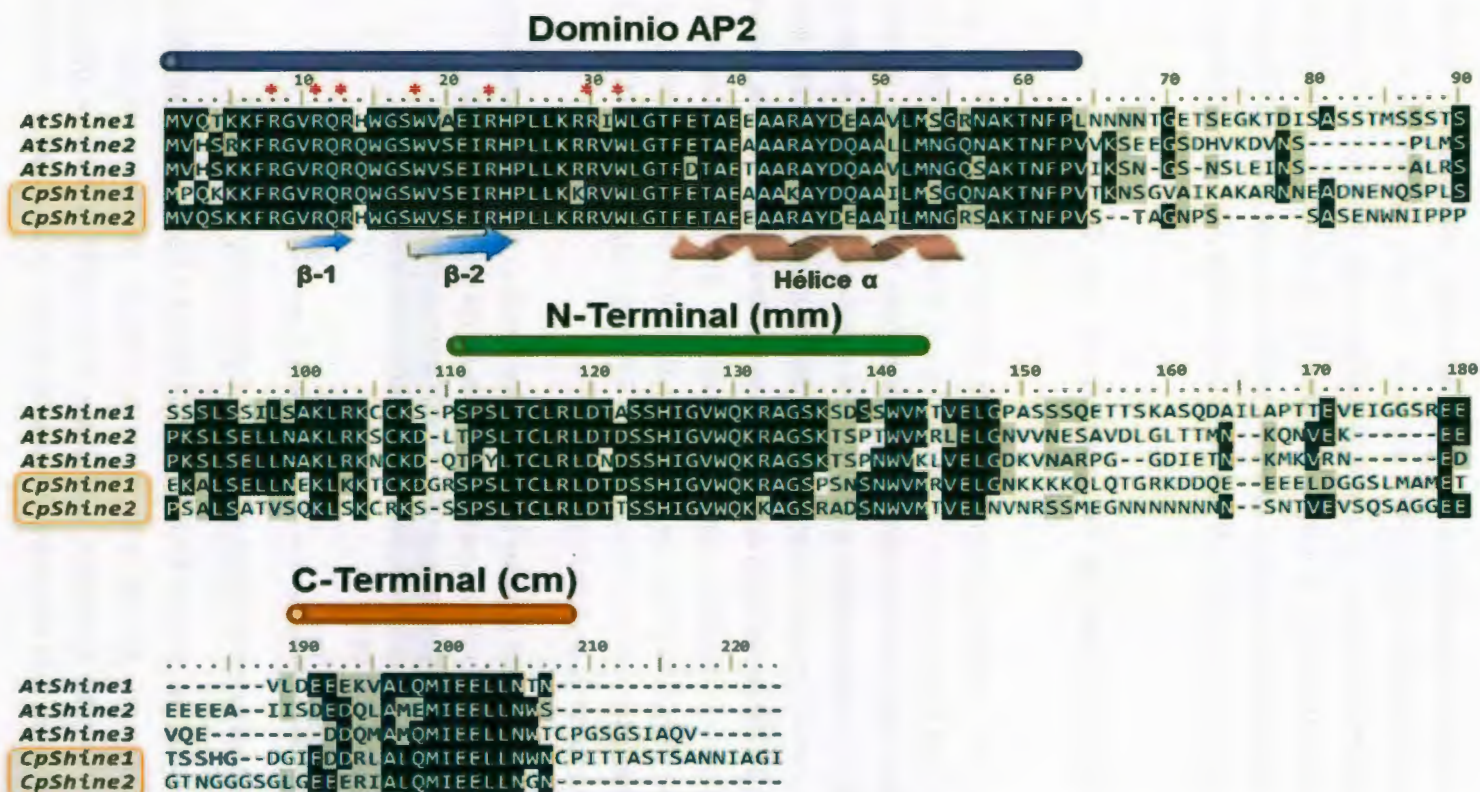


Figura II.3. Alineamiento de las secuencias de genes tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* (*AtShine1*, *AtShine2* y *AtShine3*) y las secuencias homólogas *CpShine* del genoma de *Carica papaya* var. SunUp (*CpShine1* y *CpShine 2*). Se distingue un dominio AP2 (morado), una región N-Terminal ("mm") (verde) y una región C-Terminal ("cm") (naranja). Las flechas azules corresponden a las láminas β , y el espiral a la hélice α . Los asteriscos rojos corresponden a los residuos de Triptófano (W) y Arginina (R) conservados en las secuencias. El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el blanco corresponde a aminoácidos diferentes.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Nakano *et al.*, (2006), los genes tipo *SHINE* se encuentran dentro de la familia de los ERFs, al poseer un único dominio de unión al ADN y a su vez se clasifican en el grupo V, por la presencia de dos motivos "mm" y "cm" característicos para el grupo. Aunque la función biológica de los dos motivos aún no ha sido determinada, diversos estudios sugieren que los miembros de este grupo contribuyen a la tolerancia al estrés por déficit hídrico al regular la acumulación de ceras cuticulares (Zhang *et al.*, 2007).

II.5.5. Porcentajes de identidad de las secuencias tipo *SHINE* de *Carica papaya* L.

Una vez identificados los dominios característicos de la familia tipo *SHINE* en las secuencias predichas para *Carica papaya* L. var. SunUp, se procedió a determinar los porcentajes de identidad entre las secuencias proteínicas *AtShine* de *Arabidopsis thaliana* y las secuencias *CpShine* predichas para papaya. En el Cuadro II.3, se observa que la secuencia *CpShine1* presentó mayor identidad con *AtShine1* con 86.1%, mientras que *CpShine2* presentó un 83.1% de identidad en relación a la secuencia *AtShine2*. Se señala que los altos porcentajes de identidad entre las secuencias *AtShine1* y *AtShine2* de *Arabidopsis thaliana* en comparación con las secuencias *CpShine1* y *CpShine2* de *Carica papaya* var. SunUp coinciden con los porcentajes de identidad superiores a 70% que presentaron las secuencias en el análisis *in silico*.

Cuadro II.3. Porcentajes de identidad entre las tres secuencias proteicas *AtShine* de *Arabidopsis thaliana* y las dos secuencias de la familia de genes *CpShine* de *Carica papaya* var. SunUp.

	<i>AtShine1</i>	<i>AtShine2</i>	<i>AtShine3</i>
<i>CpShine1</i>	86.1	71.4	71.5
<i>CpShine2</i>	79.4	83.1	81.5

II.5.6. Estructura tridimensional de las proteínas *CpShine1* y *CpShine2*

La estructura tridimensional del dominio AP2/ERF de *CpShine1* y *CpShine2* fue predicha por el programa Swiss-Model. En las dos proteínas aisladas en *Carica papaya* se observaron las tres estructuras β -plegadas localizadas en la región N-terminal, que se arreglan de manera paralela a la estructura α -hélice localizada en la región C-terminal

(Figura II.4). De acuerdo a Allen *et al.*, (1998), el arreglo conformacional que adquieren las estructuras β -plegadas son de gran importancia para la unión de este dominio con los elementos regulatorios en *cis* del tipo "GCC". Los modelos 3D se obtuvieron tomando como molde a la secuencia homóloga *AtERF1* (Protein Data Bank ID: 1GCC) de *Arabidopsis thaliana*.

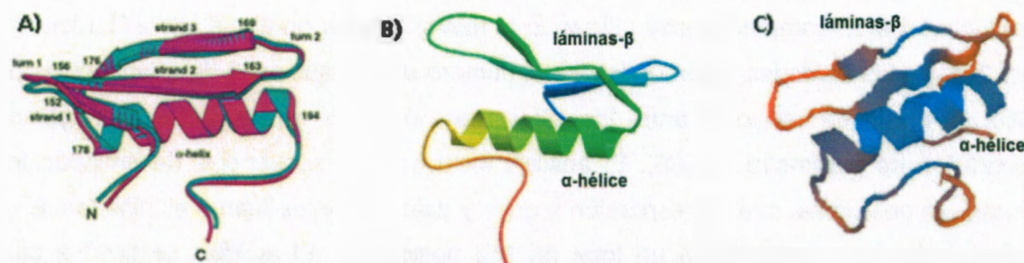


Figura II.4. Análisis de la estructura tridimensional de los dominios de unión AP2/ERF de cada secuencia de estudio. **A)** Estructura del dominio AP2/ERF de *AtERF1* descrito por Allen *et al.*, (1998). **B)** Estructura del dominio AP2/ERF de *CpShine1*. **C)** Estructura del dominio AP2/ERF de *CpShine2*. En las tres imágenes se pueden observar las 3 estructuras β -plegada y la estructura α -hélice características del dominio AP2.

II.5.7. Análisis filogenético de las secuencias de genes *SHINE* en *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L.

El árbol filogenético presentado en la Figura II.5, se construyó a partir de las secuencias tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* y las de *Carica papaya* L., el árbol presenta dos clados distinguibles. Cada uno de estos grupos muestra secuencias de genes de *Arabidopsis thaliana* agrupados con las secuencias de genes de *Carica papaya* L., que coinciden con los porcentajes de identidad presentados anteriormente. En el caso de la secuencia *AtShine1* se agrupa en un clado con *CpShine1*, por el contrario las secuencias *AtShine2* y *AtShine3* se agrupan con *CpShine2* en un segundo clado. Cada uno de los grupos que componen el árbol filogenético, están respaldados por valores altos de bootstrap.

Para la construcción de la historia evolutiva que se presenta en el árbol filogenético se utilizó el método de Neighbor-Joining (Saitou, 1987). La construcción del árbol consenso de bootstrap derivado a partir de 1000 réplicas fue utilizado para representar la historia

evolutiva de los taxa analizados (Felsenstein, 1985). Las ramas que corresponden a los fraccionamientos reproducidos en menos de 50% de las réplicas del Bootstrap son colapsadas. El porcentaje de las réplicas del árbol en el cual están asociados los taxa en la prueba de Bootstrap (1000 réplicas) están señaladas debajo de las ramas. El árbol está dibujado a escala, con las unidades de las ramas en las mismas unidades a aquellas de las distancias evolutivas utilizadas para inferir un árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computarizadas utilizando la matriz basada en el método JTT (Jones *et al.*, 2011) y las unidades están dadas en el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El rango de variación entre los sitios fue modelado con la distribución gamma (condición de parámetro = 0.36). El análisis incluye cinco secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que corresponden a gaps y datos faltantes fueron eliminadas. En el conjunto final de datos había un total de 168 posiciones. El análisis se llevó a cabo utilizando MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

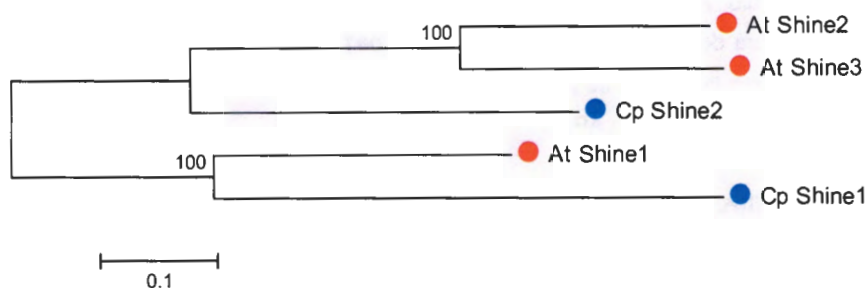


Figura II.5. Árbol filogenético donde se muestran las relaciones que existen entre las tres secuencias tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* (●) y las dos secuencias de *Carica papaya* L. (●).

II.5.8. Análisis *in silico* de genes tipo *LACS* de *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* L. cv. SunUp

Para poder estudiar y comprender mejor las respuestas a nivel molecular que intervienen en la biosíntesis de ceras totales en respuesta a un estrés por déficit hídrico se buscaron e identificaron adicionalmente, los números de accesoión para las secuencias de los genes *LACS*. Se ha visto que los genes *LACS*, en particular los *LACS2* y *LACS3* están ubicados corriente abajo en la ruta de biosíntesis de ceras y de acuerdo a lo reportado por Kannangara *et al.*, (2007) se encuentran bajo la regulación de los genes tipo *SHINE*, por

lo tanto para este estudio fue importante la identificación *in silico* de estos dos genes en particular, dentro del genoma secuenciado de *C. papaya* cv. SunUp.

Para ello, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI y TAIR (20 de Agosto del 2014), encontrando un total de 9 miembros para la familia de los genes tipo *LACS* en *Arabidopsis thaliana*. En el Cuadro II.4, se presentan los genes tipo *LACS* de *Arabidopsis thaliana* y el Locus reportado en la base de datos del NCBI.

Cuadro II.4. Secuencias tipo *LACS* y locus en *Arabidopsis thaliana* obtenidas de la base de datos del NCBI.

GENES	LOCUS
LACS (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 1 (Lacs1)	NM_130292.3
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 2 (Lacs2)	NM_103833.4
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 3 (Lacs3)	NM_105115.3
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 4 (Lacs4)	NM_118516.4
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 5 (Lacs5)	AF503755.1
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 6 (Lacs6)	NM_111471.2
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 7 (Lacs7)	NM_122642.4
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 8 (Lacs8)	NM_179603.2
<i>A. thaliana</i> , long chain acyl-CoA synthetase 9 (Lacs9)	NM_106407.6

II.5.8.1. Análisis filogenético de las secuencias de genes tipo *LACS* de *Arabidopsis thaliana*

El árbol filogenético que se presenta en la Figura II.6, muestra las relaciones existentes entre las secuencias de tipo *LACS* de *Arabidopsis thaliana*. En el árbol se distinguen tres clados o grupos. En el primero (1) se observa la presencia de subclados, las secuencias *AtLac1* y *AtLac2* se encuentran en ramas independientes, mientras las secuencias *AtLac3*, *AtLac4* y *AtLac5* están en un mismo subclado. El segundo grupo (2), está formado por *AtLac6* y *AtLac7*; y finalmente en el tercer grupo (3), se agrupan las secuencias *AtLac8* y *AtLac9*. De acuerdo a la literatura, el clado conformado por:

AtLac3/AtLac4/AtLac5 presenta un porcentaje de identidad de 72 y 80% respectivamente. El segundo grupo conformado por *AtLac6/AtLac7* comparte un 74% de identidad en los aminoácidos y finalmente *AtLac8/AtLac9* comparten un 67% de identidad. La presencia de múltiples genes en los subclados puede representar cierto nivel de solapamiento en la función y/o localización subcelular de los genes. Sin embargo, al analizarlo como grupo, esta familia sólo es 30% idéntica en relación a sus secuencias de aminoácidos (Shockey *et al.*, 2002)

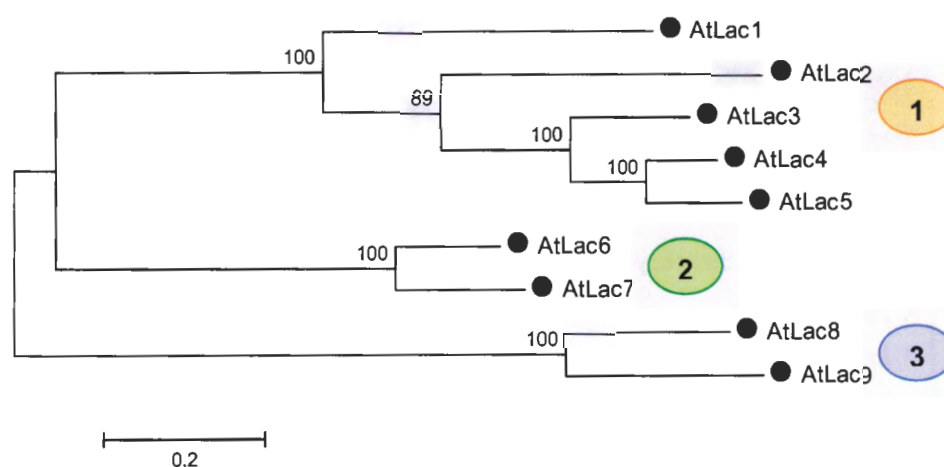


Figura. II.6. Árbol filogenético en el que se observa la relación filogenética entre las 9 secuencias de genes *LACS* presentes en *Arabidopsis thaliana*.

La historia evolutiva se infirió usando el método de Maximum Likelihood basado en el modelo de Whelan y Goldman (2001). El árbol se construyó a partir del modelo con la probabilidad más alta. El porcentaje de réplicas de árboles que se asocian con taxones agrupados se muestran a lado de las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo 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 máxima parsimonia fue utilizada, de lo contrario el método BIONJ con distancia de matriz MCL se hubiera utilizado. Una distribución gamma discreta se utilizó para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios (1 categoría (+G= 0.0000)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medida en el número de sustituciones por sitio. Se analizaron 9 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen datos

faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 636 posiciones en el conjunto final de datos. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo utilizando en programa MEGA 5.2.

II.5.8.2. Identificación *in silico* de genes tipo LACS en *Carica papaya* L.

A partir del genoma secuenciado de *Carica papaya* var. SunUp se encontraron con la ayuda del programa TBLASTX un total de 7 secuencias tipo LACS para papaya. Todas las secuencias presentaron porcentajes de identidad y similitud mayores al 75% y un valor esperado (E) $< 1E^{100}$. Las secuencias identificadas en *C. papaya* var. SunUp fueron nombradas como *CpLac1*, *CpLac2*, *CpLac3*, *CpLac4*, *CpLac5*, *CpLac6* y *CpLac7* (Cuadro II.5).

Cuadro II.5. Genes de *Carica papaya* var. SunUp que presentaron porcentajes de identidad significativamente altos con respecto a los genes LACS de *Arabidopsis thaliana*.

GENES	Nombre de secuencia Encontrada	Longitud Segmento (bp)	Longitud alineamiento (aa)	% de Identidad	% de Similitud	Valor (E)	Score
LACS							
<i>CpLac1</i>	supercontig_18.93	564	561	78	87	$1E^{-100}$	202
<i>CpLac2</i>	supercontig_62.90	1992	1750	80	90	$1E^{-116}$	307
<i>CpLac3</i>	supercontig_79.38	1983	1911	79	90	$1E^{-158}$	369
<i>CpLac4</i>	supercontig_48.58	2001	1749	82	89	$1E^{-163}$	245
<i>CpLac5</i>	supercontig_683.2	648	639	79	87	$1E^{-115}$	171
<i>CpLac6</i>	supercontig_136.40	1443	1356	76	86	$1E^{-115}$	288
<i>CpLac7</i>	supercontig_64.84	2082	1763	84	92	$1E^{-166}$	421

II.5.8.3. Alineamiento de proteínas tipo *SHINE* de *Arabidopsis thaliana* y de *Carica papaya* var *SunUp*

En el alineamiento múltiple de las secuencias tipo *LACS* de *A. thaliana* y *C. papaya* se observó que las secuencias proteínicas predichas en *C. papaya* var. *SunUp* presentaron sitios altamente conservados, correspondientes al dominio AMP-binding domain constituido de 3 bloques de acuerdo a lo reportado en la literatura (Yu, 2010). Los tres bloques (I, II y III) presentes en las secuencias analizadas, , indicados en diferentes colores en la Figura II.7, corresponden a tres motivos del dominio AMP constituidos de la siguiente manera: **I.** [MCV] TSG [TS] [ST] GXPK; **II.** GYGXTE y **III.** GW [FL] [HK] TG. La presencia del residuo de Tirosina (Y) en la posición 487, parece estar involucrado en la formación del adenilato, que participa como intermediario en la síntesis de acil-CoA. Finalmente el alineamiento mostró la presencia de un dominio de unión "linker domain" de 40 aa de largo, característico de la familia *LACS*, la longitud del dominio sugiere que las secuencias aisladas para *C. papaya* corresponden a genes de tipo *LACs* (Lu, 2010; Shockey *et al.*, 2002).

[illegible]

	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360																								
AtLac1	TN	DELH	SEI	KTY	TH	EKPE	THM	DF	IC	IM	TS	GT	PK	NG	NO	ATP	AT	DLY	QFEDK	THND	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299						
AtLac2	TS	STQK	KNC	VS	FN	SL	NL	DE	AN	LP	KE	PK	KT	IL	IM	TS	GT	PK	NG	N	A	S	VO	LS	K	E	VD	TR	S	299						
AtLac3	TS	NQNV	EKR	TH	TD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	HL	EL	AK	K	TD	EE	LS	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac4	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac5	TS	QKPE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac6	TS	TS	LS	PL	PS	SS	VS	SV	LS	KL	SN	LP	KE	PK	KT	IL	IM	TS	GT	PK	NG	TH	N	A	S	VO	LS	K	E	VD	TR	S	299			
AtLac7	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac8	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac9	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac10	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac11	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac12	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac13	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac14	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac15	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac16	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac17	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS	IL	IM	TS	GT	PK	NG	E	TL	LV	IR	KS	AN	EL	TV	VS	LA	TH	HE	YF	PF	FR	KL	---	299
AtLac18	TS	QKRE	EKL	TH	VD	KL	GG	KK	GY	LP	KE	RS																								

	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480													
AtLac1	-----	KQ	NMR	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	A	QELNPR	F	ALRKL	LA	NRYSHSK	-----	AS	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	400
AtLac2	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	410
AtLac3	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	420
AtLac4	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	430
AtLac5	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	440
AtLac6	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	450
AtLac7	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	460
AtLac8	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	470
AtLac9	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	480
Cplac1	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	490
Cplac2	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	500
Cplac3	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	510
Cplac4	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	520
Cplac5	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	530
Cplac6	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	540
Cplac7	-----	GD	Y	Q	ELKPT	LAGPRV	MT	-----	M	SASL	-----	RA	LYKHN	LA	NSPSQE	-----	AP	AK	DKGG	-----	GGGAPL	PR	FLV	YTC	550

	498	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
Atloc1	C	G	A	L	P	M	S	T	V	K	N	I	520
Atloc2	A	S	H	F	R	T	A	D	G	V	S	E	521
Atloc3	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	522
Atloc4	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	523
Atloc5	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	524
Atloc6	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	525
Atloc7	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	526
Atloc8	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	527
Atloc9	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	528
Cplac1	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	529
Cplac2	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	530
Cplac3	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	531
Cplac4	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	532
Cplac5	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	533
Cplac6	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	534
Cplac7	C	A	N	F	V	L	P	M	S	T	V	K	535

Figura II.7. Alineamiento de las secuencias de genes tipo LACS de *Arabidopsis thaliana* (*AtLac1*, *AtLac2*, *AtLac3*, *AtLac4*, *AtLac5*, *AtLac6*, *AtLac7*, *AtLac8* y *AtLac9*) y de secuencias homólogas *CpLac* del genoma de *Carica papaya* var. SunUp (*CpLac1*, *CpLac2*, *CpLac3*, *CpLac4*, *CpLac5*, *CpLac6* y *CpLac7*). Se distinguen tres bloques (I, II y III) correspondientes al dominio de unión AMP-binding domain (cuadros naranjas). Las flechas rojas indican los sitios del "Linker domain" característico de la familia LACS. El asterisco rojo, corresponde al residuo de Tirosina (Y) conservado en las secuencias. El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el blanco corresponde a aminoácidos diferentes.

II.5.8.4. Porcentajes de identidad de las secuencias *CpShine* de *Carica papaya* L.

Una vez que se identificaron los dominios característicos de la familia tipo LACS en las secuencias predichas para *Carica papaya* L. var. SunUp, se determinaron los porcentajes de identidad entre las secuencias proteínicas *AtLac* de *A. thaliana* y las secuencias *CpLac* predichas para *C. papaya* L. var. SunUp.

En este punto es importante señalar que en base a lo reportado en la literatura y en concordancia con uno de los objetivos de la presente tesis, en este estudio, se decidió trabajar con dos miembros de la familia LACS: *AtLac2* y *AtLac3*. En el Cuadro II.6, se observa que la secuencia *CpLac2* presentó un porcentaje de identidad mayor con *AtLac2* con 95.05%, mientras que *CpLac3* presentó un 95.98% de identidad en relación a la secuencia *AtLac3*. La reducción en el número de secuencias nucleotídicas LACS homólogas en el genoma de *C. papaya* L. var SunUp (7) en relación a las de *A. thaliana* (9) lo que es consistente con lo observado en estudios previos realizados por el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular (Idrovo *et al.*, 2012).

Cuadro II.6. Porcentajes de identidad entre las nueve secuencias proteicas *AtLac* de *Arabidopsis thaliana* y las siete secuencias de la familia de genes *CpLac* de *Carica papaya* var. SunUp.

	<i>AtLac1</i>	<i>AtLac2</i>	<i>AtLac3</i>	<i>AtLac4</i>	<i>AtLac5</i>	<i>AtLac6</i>	<i>AtLac7</i>	<i>AtLac8</i>	<i>AtLac9</i>
<i>CpLac1</i>	93.83	80.74	83.5	84.67	84.01	77.59	75.83	68.25	67.94
<i>CpLac2</i>	84.08	95.05	92.4	92.61	92.3	82.59	84.67	77.01	77.84
<i>CpLac3</i>	86.01	91.25	95.98	96.68	96.8	83.75	83.98	76.73	74.92
<i>CpLac4</i>	81.79	81.78	83.06	82.78	83.03	97.27	96.68	74.65	77.26
<i>CpLac5</i>	69.83	75.48	74.31	71.62	75.5	91.77	93.12	65.97	68.77
<i>CpLac6</i>	63.39	68.62	69.7	70.48	70.25	71.16	71.2	93.61	92.08
<i>CpLac7</i>	70.71	77.94	76.08	74.07	75.67	79.57	78.81	94.8	97.41

II.5.8.5. Análisis filogenético de las secuencias de genes *LACS* en *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L.

El árbol filogenético que se presenta en la Figura II.8, muestra las relaciones entre las secuencias de genes tipo *LAC* de *Arabidopsis thaliana* y las *CpLac* de *Carica papaya* L., el árbol presenta tres clados distinguibles. Cada uno de estos grupos muestra secuencias de genes de *Arabidopsis thaliana* agrupados con las secuencias de genes de *Carica papaya* L., que coinciden con los porcentajes de identidad presentados anteriormente. En el caso de la secuencia *AtLac2* se agrupa con *CpLac2* en un subclado, por el contrario *AtLac3*, *AtLac4* y *AtLac5* se agrupan en otro subclado con *CpLac3*. Cada uno los grupos que componen el árbol filogenético se respaldan con valores de bootstrap elevados.

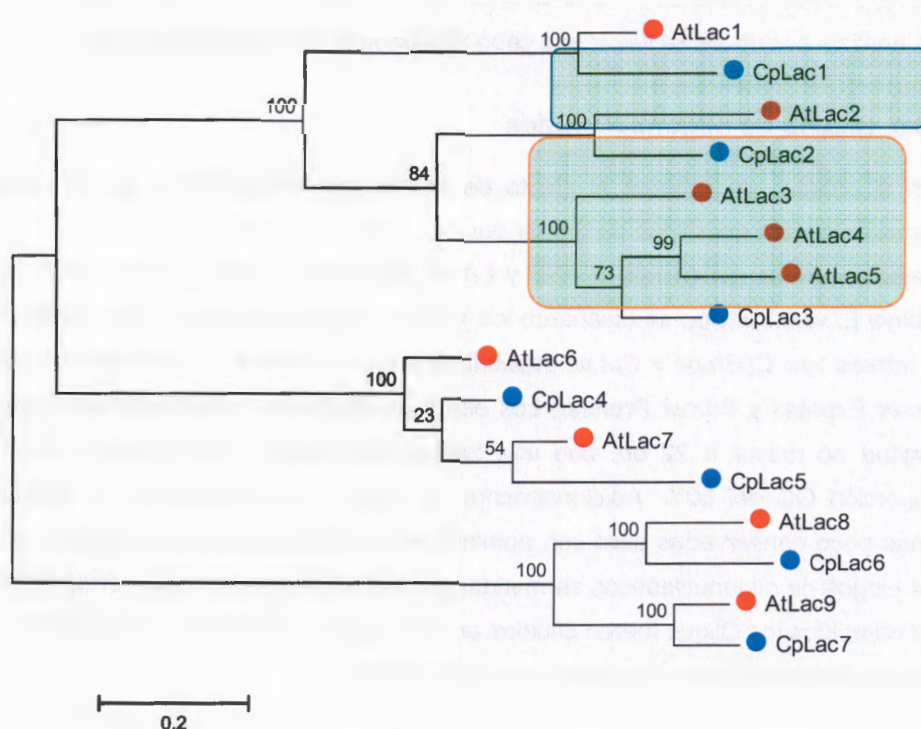


Figura II.8. Árbol filogenético donde se muestran las relaciones que existen entre las 9 secuencias tipo *LACS* de *Arabidopsis thaliana* (●) y las 7 secuencias de *Carica papaya* (●). Se señalan los genes de interés (*CpLac2* y *CpLac3*) para este estudio.

La historia evolutiva se infirió usando el método de Maximum Likelihood basado en el modelo de Whelan y Goldman (2001). El árbol se construyó a partir del modelo con la probabilidad más alta. El porcentaje de réplicas de árboles que se asocian con taxones agrupados se muestran a lado de las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo 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 máxima parsimonia fue utilizada, de lo contrario el método BIONJ con distancia de matriz MCL se hubiera utilizado. Una distribución gamma discreta se utilizó para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios (1 categoría (+G= 0.0000)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medida en el número de sustituciones por sitio. Se analizaron 16 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 702 posiciones en el conjunto final de datos. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo utilizando en programa MEGA 5.2.

II.5.9. Diseño de oligonucleótidos

Con el objetivo de estudiar el efecto del estrés por déficit hídrico en los patrones de expresión de dos genotipos de *Carica papaya* y después de haber realizado el aislamiento *in silico* para los genes tipo *SHINE* y *LACS* dentro del genoma secuenciado de *Carica papaya* L. var. SunUp., se diseñaron los juegos de oligonucleótidos para cada secuencia de interés tipo *CpShine* y *CpLac* específicos para *C. papaya* L. utilizando los programas Primer Express y Primer Premier. Los oligos se diseñaron procurando que tuvieran una longitud no mayor a 22 bp, con una temperatura media (T_m) mayor a 50 °C y una proporción GC del 50%. Adicionalmente, se buscó que el amplicón se encontrara en zonas poco conservadas pero con dominios específicos entre las secuencias predichas. Los juegos de oligonucleótidos se mandaron a sintetizar a la casa comercial Sigma y una vez obtenidos los Oligos fueron diluidos en H₂O (grado molecular) a una concentración de 10 µM y refrigerados a -20 °C hasta su uso (Cuadro II.7).

Cuadro II.7. Diseño de oligonucleótidos de las secuencias de *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3* en *Carica papaya* L.

Secuencias en <i>Carica papaya</i> L.	Secuencias de oligonucleótidos		Tamaño esperado amplicón (bp)
<i>CpShine1</i>	F	TTGTACCACTATGGTAATGGT	359
	R	CTTCAATCATACGGTCAGGA	
<i>CpShine2</i>	F	AGCCGTTAGCTTAGATGCTAG	225
	R	TTCGTAGGCTAGGATCCTGG	
<i>CpLac2</i>	F	AGTCGTACAGTACTTGACCGG	327
	R	TGGCTTTGCAACCAAGGATC	
<i>CpLac3</i>	F	AGCCGTTACGTTAGTATGTAGG	263
	R	TCGGCTAGCTGACCAGACCAT	
<i>CpEF1α</i>	F	AGCCGTTACGTTAGTCGTAGG	200
	R	TCGGCTAGCTGACCAGACCAT	

II.6. DISCUSIÓN

En este trabajo, se reporta por primera vez la identificación y caracterización *in silico* de los miembros de la familia completa de genes *SHINE* involucrados en la ruta de biosíntesis de ceras dentro del genoma secuenciado de *Carica papaya* L. var. SunUp. En total se identificaron dos secuencias nucleotídicas homólogas a *AtShine* dentro del genoma de *C. papaya* L. var. SunUp, respaldadas por porcentajes de identidad entre 70 y 73% y de similitud entre 94 y 83%. Además, la presencia de las secuencias *SHINE* en papaya es una evidencia más de su existencia conservada en diferentes especies estudiadas entre las que destacan arroz (*Oryza sativa*) (Dubouzet *et al.*, 2003), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Xin Shi *et al.*, 2011), uva (*Vitis vinifera*) (Licausi *et al.*, 2010) y eucalipto (*Eucalyptus sp.*) (Leoricy *et al.*, 2012).

Al momento de revisar las dos bases de datos, se encontraron 3 secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes tipo *SHINE* en *A. thaliana*, agrupadas en dos clados: *AtShine1* y *AtShine2* en un solo clado y *AtShine3* en uno independiente. Estas observaciones coinciden con lo reportado en los trabajos pioneros de Aharoni *et al.*, (2004) en donde evaluaron la función de estos genes en la ruta de biosíntesis de las ceras lo que confería tolerancia a un estrés por déficit hídrico y que fueron corroborados ese mismo año por Broun *et al.*, (2004).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han reportado 3 genes tipo *SHINE*, sin embargo, en *Carica papaya* L. var SunUp sólo se encontraron 2. Ésta reducción en el número de genes, parece ser consistente con lo obtenido en estudios previos del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular (Idrovo *et al.*, 2012) y concuerda con lo reportado por Ming *et al.*, (2008), quienes de manera independiente reportan una reducción en el número de genes de aproximadamente el 20% en *C. papaya* SunUp en comparación a *A. thaliana*. Ellos sugieren que la reducción en el número de genes se debe a que están relacionados con las características clave para la evolución morfológica de papaya. Esto nos indica que de manera evolutiva *C. papaya* ha conservado los genes que le han permitido adaptarse al ambiente en contraste con *A. thaliana* que ha conservado la mayor parte de sus genes.

En nuestro aislamiento múltiple realizado entre las secuencias proteicas predichas para *C. papaya* L. var. SunUp (*CpShine*) y las secuencias descargadas de las bases de datos del

NCBI para *A. thaliana*, se observó que las secuencias presentaron dominios altamente conservados, además por los altos valores de identidad de los genes *CpShine1* y *CpShine2* respecto a sus homólogos en *A. thaliana* es probable que sean alelos. En el alineamiento presentado en la Figura II.3, se señaló el dominio AP2 (morado), característico de la súper-familia AP2/ERF a la que pertenecen los genes *SHINE*, dentro del dominio se señalaron las regiones correspondientes a las láminas β y hélice α , necesarias para el plegamiento de la proteína que permite la unión con el ADN, por último, se encuentran señalados con asteriscos los residuos de Triptófano y Arginina presentes en el dominio de unión al ADN; adicionalmente, se identificaron los motivos N-terminal "mm" y C-terminal "cm" específicos para este grupo. Nuestros resultados, concuerdan con lo reportado por Aharoni *et al.*, (2004), Broun *et al.*, (2004) y Allen *et al.*, (1998), quienes señalaron que las principales características de los miembros de este grupo son: la presencia dominio AP2 altamente conservado y dos motivos adicionales ubicados en la parte N-terminal "mm" y C-terminal "cm".

En base a nuestro alineamiento se observó que las secuencias proteicas *CpShine* presentan sólo un dominio AP2 altamente conservado y dos motivos adicionales ubicados en la región N-terminal y C-terminal. De acuerdo a la clasificación propuesta por Nakano *et al.*, (2006), nuestras secuencias *CpShine* pertenecen a la súper familia AP2/ERF, familia de los ERFs, dentro de la cual son agrupadas en el grupo V-a, debido a la presencia de los dos motivos adicionales. En *A. thaliana*, existe otro gen que contiene los dominios específicos de clado *SHINE*, el gen At5g25190; sin embargo, al ser sobre-expresado no se obtiene el fenotipo morfológico característico de los miembros del clado, debido en principio, a la carencia de un motivo "mm" completo por lo que ha sido clasificado en el grupo V-b (Aharoni *et al.*, 2004).

A la fecha no se ha identificado la función biológica del motivo "mm", sin embargo en un estudio realizado por Taketa *et al.*, (2008), reportaron una mutante *nud*, un ortólogo de *WIN1/SHN1* en cebada (*Hordeum vulgare* L.) con el "mm" incompleto, como resultado, se obtuvo un fenotipo morfológicamente diferente, lo que sugiere que el motivo "mm" contiene un sitio activo importante. En un estudio reciente realizado por Nakano *et al.*, (2014), se evaluaron las diferencias estructurales entre el gen *SIERFS2* aislado en tomate (*Solanum lycopersicum*) perteneciente al grupo V-b y los genes tipo *SHINE* de *A. thaliana* (V-a), los resultados indicaron que la falta del motivo completo "mm" puede ser la causa

de la diversidad biológica observada en cuanto función. La elucidación de la función del motivo "mm" brindará información valiosa sobre la diversidad funcional entre los subgrupos dentro del grupo V de la familia de los ERFs V-a, incluyendo a los genes tipo *SHINE*.

La importancia del dominio AP2 altamente conservado dentro de la súper familia AP2/ERF, se debe a que es el dominio de unión al ADN, por lo que una diferente conformación puede llevar a un plegamiento incorrecto de la proteína y por ende a que el ADN no se una a la secuencia. Para descartar que nuestras secuencias tuvieran errores en el plegamiento del dominio se realizó un modelaje de proteína, observando que las dos secuencias presentan las dos láminas β antiparalelas y la hélice α necesarias para el plegamiento correcto (Figura II.4).

Nuestro árbol filogenético expone semejanzas sobre la posición de los genes tipo *SHINE* en *Carica papaya* al establecer comparaciones estructurales con *Arabidopsis thaliana*. Las secuencias *CpShine* se agruparon en dos clados principales los cuales presentaron valores de estimación bootstrap altos (>100). En el primer clado se agrupó *CpShine1* con su homólogo *AtShine1*, por otra parte, *CpShine2* se agrupó con *AtShine2* y *AtShine3*. Las diferencias en cuanto al agrupamiento puede deberse a la divergencia en el dominio "mm" lo que puede influir en la función biológica del gen. Los datos obtenidos del análisis filogenéticos coinciden con los reportado por Dubouzet *et al.*, (2003), quienes observaron que el homólogo de *OsDREB1* en arroz, presentaba mayor porcentaje de identidad con *AtShine1* que con los demás.

Los análisis *in silico* realizados en este capítulo, indicaron la presencia del dominio AP2, las regiones lámina β y la hélice α , los residuos de Triptófano y Arginina; y la presencia de los dos motivos adicionales: "mm" y "cm" en las secuencias proteicas de *CpShine*. Adicionalmente, los altos porcentajes de identidad y la relación filogenética existente entre las secuencias tipo *SHINE* de *Carica papaya* y las de *Arabidopsis thaliana*, brindan suficiente información para concluir que *CpShine* conforma una pequeña familia génica de dos miembros dentro del genoma secuenciado de *Carica papaya* var. SunUp.

Adicionalmente, se reporta la caracterización *in silico* de la familia completa de los genes LACS (Long-acyl-CoA sintasa) involucrados en la ruta de biosíntesis de ceras cuticulares en *Arabidopsis thaliana*. En total se identificaron 7 secuencias nucleotídicas homólogas a

AtLac dentro del genoma secuenciado de *C. papaya* var. SunUp, con porcentajes de similitud e identidad superiores al 75%. Para este estudio se eligió trabajar únicamente con las secuencias homólogas a *AtLac2* y *AtLac3*, nombradas como *CpLac2* y *CpLac3*.

Al igual que en el caso de los genes *SHINE*, se observó una reducción en el número de genes para *CpLac* que para papaya fue de 7 en comparación con las 9 secuencias reportadas para *Arabidopsis thaliana*.

En base al alineamiento realizado se observó que las secuencias proteicas *CpLac* presentaron la firma característica de los miembros de la familia *LAC*, el dominio de unión AMP. De acuerdo a lo reportado en la literatura, el dominio AMP tiene un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos (Shrago, 2000). Aunado a la presencia del dominio conservado, el alineamiento presentó el "linker domain" en las 7 secuencias candidatas *CpLac*, con un largo aproximado de 40 aa de largo, comparable con los 30 a 40 aa de largo del "linker domain" reportado para la mayoría de los genes putativos de *LACS*. Se ha reportado que el alineamiento con secuencias homólogas de *LACS* en otros organismos eucariotas como levaduras, ratón y humano; indican que la longitud del "linker domain" se mantiene dentro de estos rangos. Lo que sugiere que la presencia de ésta región permite la función de los genes *LACS* (Johnson *et al.*, 1994; Abe *et al.*, 1992; Fujino y Yamamoto, 1992).

El aislamiento *in silico* de las secuencias *CpShine* y *CpLac* de *Carica papaya* var. SunUp nos sirvió como punto de partida para el diseño correspondiente de los oligonucleótidos específicos para las secuencias de interés con el objetivo de evaluar los patrones de expresión de éstos genes en los diferentes tejidos (raíz, tallo y hoja) de plantas de dos genotipos de *C. papaya* Maradol y Silvestre expuestos a un tratamiento por déficit hídrico detallado en el Capítulo III.

II.7. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo, se reporta por primera vez la caracterización *in silico*, identificación y relación filogenética de la familia completa de genes tipo *CpShine* (2), pertenecientes a la familia de factores de transcripción AP2/ERF dentro del genoma secuenciado en *Carica papaya* L. var SunUp. Además, se reporta la caracterización de la familia completa de los genes tipo *CpLac* (7), involucradas en la ruta de biosíntesis de las ceras dentro del genoma secuenciado de papaya transgénica.
- Las dos secuencias en *Carica papaya* L. homólogas a los genes *SHINE* de *Arabidopsis thaliana*, presentaron porcentajes de identidad mayores al 70% con valores esperados de E entre 10^{-62} y 10^{-56} ; y se nombraron *CpShine1* y *CpShine2* tomando en cuenta los porcentajes de identidad con respecto a *A. thaliana* que fueron de 86.1 y 83.1% respectivamente. Para el caso de las secuencias homólogas a *LACS* de *A. thaliana* encontradas en *C. papaya*, éstas presentaron porcentajes de identidad y similitud mayores a 75% con valores esperados de 10^{-116} y 10^{-158} , y se nombraron *CpLac2* y *CpLac3* en base a los altos porcentajes de identidad de 95 y 95.8% comparados con las secuencias de *A. thaliana*.
- La reducción en el número de secuencias dentro del genoma de *C. papaya* en comparación con *A. thaliana* es consistente con la reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20% reportada por Ming *et al.*, (2008) y con los resultados obtenidos en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular (Idrovo *et al.*, 2012).
- El alineamiento diseñado entre las secuencias proteínicas de *CpShine1* y *CpShine2* presentaron los dominios característicos de la familia *SHINE* reportados en *A. thaliana*. Los dominios altamente conservados fueron: el dominio de unión al ADN (AP2), el motivo N-terminal ("mm") y el motivo C-terminal ("cm"). En el caso del dominio AP2 se encontraron mediante el modelaje tridimensional de la proteína, regiones correspondientes a las 3 láminas β -anti paralelas y una hélice α presentes en el dominio AP2, el cual es requerido para el reconocimiento específico del ADN.
- El árbol filogenético demostró que las secuencias *CpShine* se agrupan en el mismo clado en comparación con lo reportado para *A. thaliana*. Para el caso de la

secuencia *CpShine1* se agrupó en el mismo clado que *AtShine1*, por el contrario *CpShine2* se agrupó con *AtShine2* y *AtShine3*, lo que sugiere que ambos genes podrían estar involucrados en funciones específicas.

- En el alineamiento realizado entre las secuencias proteicas de *CpLac1*, *CpLac2*, *CpLac3*, *CpLac4*, *CpLac5*, *CpLac6* y *CpLac7* se observó la firma característica de la familia LACS reportada para *A. thaliana*. El dominio de unión AMP y las dos regiones laterales del "linker domain", se encuentran conservados en las secuencias de *C. papaya* L. (Figura II.7).
- El árbol filogenético demostró que las secuencias *CpLac* se agrupan dentro del mismo clado en comparación con lo reportado para *A. thaliana*. Para el caso de la secuencia *CpLac2* se agrupó en el mismo clado que *AtLac2*, por el contrario *CpLac3* se agrupó con *AtLac3*, *AtLac4* y *AtLac5* en un mismo subclado, lo que sugiere que la función de ésta secuencia no es tan específica como en el caso de *CpLac2*.

II.8. BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel y A. Pereira (2004). The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**. 2463-2480.
- Allen, M.D., K. Yamasaki, M. Ohme-Takagi, M. Tateno y M. Suzuki (1998). A novel model of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.*, **17**:5484–5496.
- Alonso, J.M., A.N. Stepanova, T.J. Leisse, C.J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D.K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C.C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D.E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W.L. Crosby, C.C. Berry y J.R. Ecker (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653–657.
- Andrews, J., y K. Keegstra (1983). Acyl-CoA synthetase is located in the outer membrane and acyl-CoA thioesterase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Physiol.*, **72**:735–740.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Koop y T. Schwede (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**:195-201.
- Babbitt, P.C., G.L. Kenyon, B.M. Martin, H. Charest, M. Slyvestre, J.D. Scholten, K.H. Chang, P.H. Liang y D. Dunaway-Mariano (1992). Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/ isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry*, **31**:5594

- Bordoli, L., F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey y T. Schwede (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, **4**:1-13.
- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Broun, P., O. Poindexter, E. Osborne, C.Z. Jiang y J.L. Riechmann (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. cad. Sci. USA.*, **101**:4706-4711.
- Cheong, Y.H., B.C. Moon, J.K. Kim, M.C. Kim, I.H. Kim, C.Y. Park, J.C. Kim, B.O. Park, S.C. Koo, H.W. Yoon, W.S. Chung, C.O. Lim, S.Y. Lee y M.J. Cho (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcriptor factor. *Plant Physiol.*, **132**:1961-1972.
- Dubouzet, J.G., Y. Sakuma, Y. Ito, M. Kasuga, E.G. Dubouzet, S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki y K. Yamaguchi-Shinozaki (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant J.*, **33**:751-763.
- Ecker, J.R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**:667-675.
- Evans, M.M., H.J. Passas, y R.S. Poethig (1994). Heterochronic effects of glossy15 mutations on epidermal cell identity in maize. *Development*, **120**, 1971-1981.
- FAO (2008) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Origen y distribución de *Carica papaya* L. Disponible en: www.fao.org.
- FAOSTAT (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Estadísticas de la *C. papaya* L. Disponible en: <http://faostat.fao.org>.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**:783-791.

- Fulda, M., J. Shockey, M. Werber, F.P. Wolter y E. Heinz (2002). Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant J.* **32**: 93–103.
- Gale, M.D. y K.M. Devos (1998). Plant comparative genetics after 10 years. *Science* **282**(5389):656-659.
- Gene Project (2009). - Bioinformatics Software-Altavista. Bioinformatics Software for data analysis, manipulation and view. Blast Parser, polmTree, PSI Protein Classifier. Disponible en: <http://geneproject.altavista.org/>
- Gonsalves, D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: a case of study. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 415-437.
- Groot, P.H., H.R. Scholte y W.C. Hulsmann (1976). Fatty acid activation: specificity, localization, and function. *Adv Lipid Res.*, **14**: 75.
- Gutterson, N. y T.L. Reuber (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**:465–471.
- Haake, V., D. Cook, J.L. Riechmann, O. Pineda, M.F. Thomashow, y J.Z. Zhang (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **130**:639–648.
- Hall, T.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.
- Hao, D., M. Ohme-Takagi y A. Sarai (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J. Biol. Chem.* **273**:26857–26861.
- Hen-Avivi, S. J. Lashbrooke, F. Costa y A. Aharoni (2014). Scratching the surface: genetic regulation of cuticle assembly in fleshy fruit. *J. Exp. Bot.*, **65**(16): 4653-4664.
- Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins y T.J. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment

- through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**:4673-4680.
- Idrovo, F.M., S. P-E, G. Fuentes y J.M. Santamaría (2012). *In silico* cloning and characterization of the TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors subfamily in *Carica papaya*. *Plant Physiol. Bioch.*, **54**:113-122.
- Jaglo-Ottosen, K.R., S.J. Gilmour, D.G. Zarka, O. Schabenberger y M.F. Thomashow (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces cor genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280**:104-106.
- Jofuku, K.D., B.G. Den Boer, M. Van Montagu y J.K. Okamoto (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell.*, **6**(9):1211-1225.
- Jones, D.T., W.R. Taylor y J.M. Thornton (2011). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, **8**: 275-282.
- Kannangara, R., C. Branigan, Y. Liu, T. Penfield, V. Rao, G. Mouille, H. Höfte, P. Herman, R. Markus y J.L. Broun Pierre (2007). The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **19**:1278-1294.
- Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.*, **17**(3):287-291.
- Kunst, L. y A.L. Samuels (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.*, **42**:51-80.
- Kurniawan, R. (2005). Comparative Analysis of Drought resistance genes in Arabidopsis and rice. Tesis de Doctorado. Universidad de Wageningen, Países Bajos. pp.41-51
- Lee, J.H., J.P. Hong, S.K. Oh, S. Lee, D. Choi y W.T. Kim (2004). The ethylene-responsive factor like protein 1 (CaERFLP1) of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) interacts in vitro with both GCC and DRE/CRT sequences with different binding affinities: Possible biological roles of CaERFLP1 in response to pathogen infection

- and high salinity conditions in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol. Report.*, **55**:61-81.
- Lee, S.B. y M.C. Suh (2013). Recent advances in cuticular wax biosynthesis and its regulation in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*, **6**:246–249.
- Leoricy W., M. Mendes, E.L. Oliviera, J. Lepikson-Neto, R. Augusto, L. Costa y G. Guinaraes (2012). Identification of four *Eucalyptus* genes potentially involved in cell Wall biosynthesis and evolutionarily related to *SHINE* transcription factors. *Plant Growth Regul.*, **69**(2):203-208.
- Licausi, F., F. Giorgi, S. Zenoni, F. Osti, M. Pezzotti y P. Perata (2010). Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics*, **11**:719.
- Ming,R., S. Hou, Y.Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J.H. Saw, P. Senin, W. Wang, B.V. Ly, K.L.T. Lewis, S.L. Salzberg, L. Feng, M.R. Jones, R.L. Skelton, J.E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R.E. Paull, T.P. Michael, K. Wall, D.W. Rice, H. Albert, M.L. Wang, Y.J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R.A. Acob, P. Guan, A. Blas, C.M. Wai, C.M. Ackerman, Y.Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J.K. Na, E.V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J.E. Bowers, A.R. Gschwend, A.L. Delcher, R. Singh, J.Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M.J. Torres, F. Alex Feltus, B. Porter, Y. Li, A.M. Burroughs, M.C. Luo, L. Liu, D.A. Christopher, S.M. Mount, P.H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M.A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D.E. Shippen, C.W. de Pamphilis, J.D. Palmer, M. Freeling, A.H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang y M. Alam. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, **452**: 991-997.
- Moose, S.P. y P.H. Sisco (1996). Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes y Development*. **10**:3018–3027.
- Moose, S.P. y P.H. Sisco (1994). Glossy15 controls the epidermal juvenile-to adult phase transition in maize. *Plant Cell*, **6**:1343–1355.

- Muñozcano, M. y C.O. Martínez (2008). Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa, A.C. pp.1-13.
- Nakano, T., K. Zuki, T. Fujimura y H. Shinshi (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.*, **140**:411–432.
- Nakano, T., M. Fujisawa, Y. Shima y Y. Ito (2014). The AP2/ERF transcription factor SIERF52 functions in flower pedicel abscission in tomato. *J. Exp. Bot.*, **65**(12):3111-3119.
- Nawrath, C. (2006). Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**:281–287.
- O'Donnell, P.J., C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H.M.O. Leyser y D.J. Bowles (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, **274**:1914–1917.
- Ohme-Takagi, M. y H. Shinshi (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, **7**:173–182.
- Okamuro, J.K., B. Caster, R. Villarroel, M. Van Montagu y K.D. Jofuku (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**:7076-7081.
- Penninckx, I.A., K. Eggermont, F.R. Terras, B.P. Thomma, G.W. De Samblanx, A. Buchala, J.P. Métraux, J.M. Manners y W.F. Broekaert (1996). Pathogen induced systemic activation of a plant defense in gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**:2309–2323.
- Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O.J. Ratcliffe, R.R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J.Z. Zhang, D. Ghandehari, B.K. Sherman, y G. Yu (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**:2105–2110.
- Saitou, N. y M. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-42.

- Schnurr, J., J. Shockey y J. Browse (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **16**:629–642.
- Schnurr, J.A., J. Shockey, G.J. deBoer y J. Browse (2002). Fatty acid export from the chloroplast: Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzymeA synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **129**:1700–1709.
- Sharma, M.K., R. Kumar, A.U. Solanke, R. Sharma, A.K. Tyagi y A.K. Sharma (2010). Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics y Genomics*, **284**:455–475.
- Shinozaki, K. y K. Yamaguchi-Shinozaki (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **3**:217-223.
- Shockey, J., M. Fulda, y J. Browse (2002). *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzymeA synthetases that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol.* **129**:1710–1722.
- Shrago, E. (2000). Long-Chain Acyl-CoA as a Multi-effector Ligand in Cellular Metabolism. *J. Nut.*, **130**(2): 290-293.
- SOFTBERRY (2013). Disponible en: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>.
- Solovyev, V., P. Kosarev, I. Seledsov, y D. Vorobyev (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol.*, **7**(1):10.1-10.12.
- Taketa, S., S. Amano, Y. Tsujino, T. Sato, D. Saisho, K. Kakeda, M. Nomura, T. Suzuki, T. Matsumoto, K. Sato, H. Kanamori, S. Kawasaki y K. Takeda (2008). Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**(10):4062-4067.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

- Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Whelan, S. y N. Goldman (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, **18**:691-699.
- Wolfe, K.H., M. Gouy, Y.W. Yang, P.M. Sharp y W.H. Li (1989). Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**(16):6201-6205.
- Xin Shi, J., A. Adato, N. Alkan, Y. He, J. Lashbrooke, A.J. Matas, S. Meir, S. Malitsky, T. Isaacson, D. Prusky, D. Leshkowitz, L. Schreiber, A.R. Granell, E. Widemann, B. Grausem, F. Pinot, J.K.C. Rose, I. Rogachev, C. Rothan y A. Aharoni (2013). The tomato *SISHINE3* transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning, *New Phytol.* **197**:468-480.
- Xin Shi, J., S. Malitsky, S. De Oliveira, C. Branigan, R.B. Franke, L. Schreiber y A. Aharoni (2011). *SHINE* Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. *PLos Genet.*, **7**(5):371-388.
- Xu, Z.S., L.Q. Xia, M. Chen, R.Y. Zhang, L.C. Li, Y.X. Zhao, Y. Lu, Z.Y. Ni, L. Liu, Z.G. Qiu, y Y.Z. Ma (2007). Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. Ethylene-responsive factor 1 (*TaERF1*) that increases multiple stress tolerance. *Plant Mol. Biol.*, **65**:719-732.
- Xu, Z.S., M. Chen, L.C. Li y Y.Z. Ma (2011). Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement, *J. Integr. Plant Biol.*, **53**:570-585.
- Xue, Y., S. Xiao, J. Kim, S.C. Lung, L. Chen, J.A. Tanner, M. C. Suh y M. L. Chye (2014). *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 is involved in stem cuticle formation. *J. Exp. Bot. Adv.*, **65**:5473-5483.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**: 781-803.

- Yang, S.O., S.C. Wang, X.G. Liu, Y. Yu, L. Yue, X.P. Wang y D.Y. Hao (2009). Four divergent *Arabidopsis* ethylene-responsive element-binding factor domains bind to a target DNA motif with a universal CG step core recognition and different flanking bases preference. *FEBS Journal* **276**:7177–7186.
- Yu, L (2010). *In Silicon* Cloning and Analysis of a *LACS* Gene from *Glycine Max* (L.) *Int. J. Biol.*, **2**(1):111-116.
- Zhang, G., M. Chen, L. Li, Z. Xu, X. Chen, J. Guo, y Y. Ma (2009). Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Biol.*, **60**:3781-3796.
- Zhang, J.Y., C.D. Broeckling, L.W. Sumner y Z.-Y. Wang (2007). Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, *WXP1* and *WXP2*, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol. Biol.*, **64**:265-278.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner y W. Miller (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J. Comput. Biol.*, **7**(1-2):203-214.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA FISIOLOGÍA DE 2 GENOTIPOS DE *Carica papaya* MARADOL Y SILVESTRE

III.1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es una realidad inminente con repercusiones que inciden en la estructura y funcionalidad de los ecosistemas. En particular, el estrés abiótico por déficit hídrico, más que otros factores ambientales, deja en la planta una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente su desarrollo y productividad (Bluden y Arndt, 2012; Wang *et al.*, 2012, GISS, 2010; Shao, *et al.*, 2008) El estrés por déficit hídrico puede considerarse como un conjunto de presiones de clima, que puede ser el resultado de una combinación de calor, déficit de agua en el suelo y salinidad. En conjunto el déficit hídrico y la salinidad limitan considerablemente la producción agrícola hasta un 70% comparándolo con lo obtenido bajo condiciones favorables (Boyer, 1982).

El agua desempeña un papel esencial en las plantas como componente, disolvente y reactivo en diferentes procesos químicos, mantiene la turgencia, la elongación celular, el intercambio gaseoso en hojas, el transporte en el floema y varios procesos a través de la membrana (Taiz y Zeiger, 2006). La importancia fisiológica del agua se refleja en su función ecológica, ya que la distribución de las plantas sobre la superficie de la tierra está controlada por la disponibilidad de agua, siempre que tengan una temperatura adecuada de crecimiento. Sin embargo, en condiciones naturales el estrés por déficit hídrico se encuentra asociado al estrés térmico y es difícil separar ambos efectos en las plantas, el déficit hídrico produce cierre estomático lo que disminuye la tasa de transpiración, la disipación del calor también se ve afectada con el consiguiente incremento de la temperatura foliar. La radiación solar por otra parte, es un factor que participa directamente en el proceso fotosintético, al igual que el agua, minerales, CO₂ y la temperatura (Ortiz, 2006). De manera conjunta, todos estos factores afectan el crecimiento, el transporte de nutrientes, la respiración, la transpiración y todos los procesos involucrados en el desarrollo vegetal.

A la fecha, se han estudiado los efectos que tiene el estrés por déficit hídrico sobre muchos de los procesos vitales. Entre los efectos más evidentes están el tamaño de la planta, número de hojas y grosor del tallo, la tasa de fotosíntesis, la conductancia estomática y la acumulación de hormonas (Parés *et al.*, 2008; Nonami *et al.*, 1997; Munns y Gramer, 1996, Ogen y Öquist, 1985; Boyer, 1970). Muchos de estos efectos se correlacionan con la disminución en los valores de potencial hídrico de la hoja, lo que determina el funcionamiento del tejido foliar bajo un estrés por déficit hídrico (Sardans *et al.*, 2008; Hsiao, 1976).

Para adaptarse al estrés por déficit hídrico y a ambientes de luz intensa, las plantas terrestres han desarrollado diversas estrategias de adaptación al estrés, que son más evidentes en las plantas Silvestres que habitan las regiones áridas y semi-áridas. El estudio del comportamiento fisiológico de las plantas en diferentes condiciones ambientales es importante para entender las causas de las reducciones en el rendimiento de los cultivos. Finalmente, el desarrollo de cultivos tolerantes a un estrés por déficit hídrico con mayor eficiencia en el uso del agua es de interés general, debido al continuo crecimiento de la población mundial y a la disminución del recurso hídrico destinado a la agricultura (Nguyen, 1999).

III.1.1. Clasificación de los tipos de respuesta de la planta ante un estrés por déficit hídrico

Bajo condiciones ambientales y agrícolas, las plantas están frecuentemente expuestas a un estrés ambiental. Algunos de estos factores ambientales, como la temperatura del aire, pueden ser estresantes en cuestión de minutos, otros, como el contenido de agua en el suelo, puede tomar varios días o semanas, y factores como la deficiencia de minerales en el suelo pueden tardar meses en convertirse limitantes. Adicionalmente, el estrés determina la distribución de las plantas en función de los suelos y climas. Por lo tanto, la comprensión de los procesos fisiológicos que son afectados por el estrés así como aclimatación de las plantas es de gran importancia tanto para la agricultura y el medio ambiente.

En respuesta a un estrés por déficit hídrico del suelo, las plantas pueden exhibir mecanismos en respuesta al estrés clasificados como: escape, evasión o tolerancia al déficit hídrico (Price *et al.*, 2002; Levitt, 1980).

- **Escape al déficit hídrico.** Es la habilidad de la planta a completar su ciclo de vida antes de ser afectada severamente por el estrés.
- **Evasión del déficit hídrico.** En plantas de ciclo de vida largo se presentan mecanismos que le ayudan a mantener potenciales hídricos (Ψ_H) elevados, aún bajo condiciones de déficit hídrico extremas. Tales mecanismos incluyen adaptaciones morfo-anatómicas: baja en la proporción superficie/volumen, desarrollo de espinas, aumento en el área radial. Estos mecanismos tienen como finalidad reducir la pérdida de agua a través de la transpiración (estomática y cuticular), la conductancia estomática y el área de la hoja (Price *et al.*, 2002; Ortíz-Hernández *et al.*, 1999; Begg, 1980).
- **Tolerancia al estrés por déficit hídrico.** Es la capacidad que presentan algunas plantas de sobrevivir aún con Ψ_H bajos (Ingram y Bartels, 1996). Las plantas expuestas a un estrés por déficit hídrico pueden desarrollarse mediante otros mecanismos, que le permiten mantener la turgencia de los tejidos y reducir la pérdida evaporativa del agua al acumular solutos compatibles lo cual es una ventaja adaptativa de las plantas al déficit hídrico (Yancey *et al.*, 1982; Levitt, 1980).

III.1.2. Efectos fisiológicos ocasionados por el déficit hídrico en plantas

El estrés hídrico ocurre cuando la cantidad de agua que se evapora mediante la transpiración es superior a la que la planta es capaz de incorporar a través de sus raíces. En estas condiciones sobreviene un déficit hídrico, cuya primera manifestación visible es la marchitez característica de las hojas. En caso de que el déficit se prolongue el crecimiento se reduce hasta detenerse (Granados-Sánchez *et al.*, 1998).

Típicamente, conforme el contenido de agua disminuye sus células se contraen y se relajan las paredes celulares. Esto genera que la presión de turgencia (Ψ_T) se reduzca y se concentre una mayor cantidad de solutos en las células. La membrana plasmática se vuelve más delgada y se comprime, porque cubre un área más pequeña que antes. Debido a que el Ψ_T , es el principal parámetro afectado por el estrés hídrico, las actividades relacionadas al Ψ_T , como la expansión de la hoja y la elongación de las raíces son las más sensibles al déficit hídrico (Taiz y Zeiger, 2006).

El aumento en la temperatura ambiental, la luz intensa y la poca disponibilidad del agua alteran la tasa fotosintética, la tasa respiratoria, el contenido de pigmentos fotosintéticos, la viabilidad de plántulas, la biomasa al disminuir el desarrollo y la expansión de hojas e incluso la abscisión foliar. Se promueve el cierre de estomas, la afectación al desarrollo de sistemas radicales, reduciendo la velocidad con la que absorben agua y nutrientes las raíces, disminuye la floración y por lo tanto el rendimiento por planta. También pueden facilitar el ataque de insectos y el desarrollo de enfermedades. (Hewezi *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2002; Betts, 1997).

III.1.3. Estrés por déficit hídrico en *Carica papaya* L.

Carica papaya L. es una planta semi-leñosa, considerada tolerante al déficit hídrico, sin embargo, es muy receptiva a la irrigación, por lo que la disponibilidad de agua en el suelo limita los procesos fisiológicos y el rendimiento de la planta (Carr, 2013; Mahouachi *et al.*, 2007; Clemente y Marler 1996; Marler *et al.*, 1994). Se recomienda un riego constante a las plantas durante los períodos secos para aumentar el crecimiento y producción de frutos (Malo y Campbell, 2006), sin embargo, un exceso de agua puede afectar de manera negativa varios procesos fisiológicos y favorecer el ataque de patógenos en raíces (Campostrini *et al.*, 2010; Campostrini y Glenn, 2007).

Debido a la importancia económica y nutricional de *Carica papaya*, se han realizado diversos estudios para evaluar la respuesta fisiológica de la planta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico: ataque de patógenos, virus, salinidad, altas temperaturas y déficit hídrico (Alcocer, 2013). En particular, se ha estudiado el comportamiento fisiológico de plantas de *C. papaya* ante un estrés hídrico, encontrando que el contenido relativo de agua en las hojas y el potencial de presión en el xilema no se ven afectados por la poca disponibilidad de agua. Esto clasifica a *C. papaya* como una especie que responde al déficit hídrico evadiendo el estrés (Marler *et al.*, 1994). También se ha indicado que el ajuste osmótico y el mantenimiento del sistema de conductividad de agua por la raíz, característico de algunas plantas que toleran el estrés por déficit hídrico posponiendo la deshidratación del tejido, está también presente en las plantas de papaya bajo estrés por déficit hídrico (Stokes y Stokes, 2000). Por otra parte, se ha visto que el intercambio gaseoso en las hojas de papaya se reduce bajo condiciones de déficit hídrico (Marler y Mickelbart, 1998; Marler *et al.*, 1994). Adicionalmente, la disminución en la humedad del

suelo reduce la altura de planta, el diámetro del tronco, el número de hojas unidas al tallo, hay un retraso en el crecimiento y desarrollo de las frutas de papaya. Por último, se ha visto que el estrés por déficit hídrico en *C. papaya* genera un aumento en la longitud de la raíz respecto al tallo, lo que puede considerarse como un mecanismo de tolerancia al estrés (Ivonne y Mirando, 2007).

En un estudio realizado por Ang y Ng (2000), evaluaron la concentración de elementos pesados en frutos Mango (*Mangifera indica* L.), Guayaba (*Psidium guajava* L.) y Papaya (*Carica papaya* L.) cultivados en tierras agrícolas y ex mineras. Ellos reportaron que los frutos de papaya crecían mejor que las otras dos especies en las tierras ex mineras caracterizadas por la alta temperatura del aire y baja disponibilidad del agua. En base a estos resultados, los autores sugieren que papaya al ser una planta con propiedades suculentas puede tener una estrategia diferente para cubrir el déficit hídrico en sus tejidos, conservando el agua en el tejido como el caso de los cactus (Petit-Jiménez, 2007). Mahouachi *et al.*, (2006, 2007, 2012) reportaron que *C. papaya* responde al déficit hídrico disminuyendo el crecimiento en la planta, el intercambio gaseoso en hojas y promoviendo la abscisión foliar. Además, los autores sugieren que el ácido Abscísico (ABA) puede estar involucrado en la inducción de muchas respuestas fisiológicas como la inducción al cierre estomático y la abscisión de las hojas para reducir la pérdida de agua (Gomes *et al.*, 2013).

En un estudio previo realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular (Fuentes, 2006, datos no publicados), se estudió la respuesta de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre a un estrés por déficit hídrico de 14 días. Los resultados indicaron que en base a los parámetros analizados de altura (cm) y fotosíntesis (Pn), las plantas Silvestre presentan mayor tolerancia en comparación a Maradol.

III.2. HIPÓTESIS

La falta de agua por un tiempo prolongado afectará negativamente la fisiología de las plantas de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre, afectándose en mayor grado a Maradol. Además, la capacidad de recuperación de los genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre dependerá de la intensidad y duración del estrés.

III.3. OBJETIVOS

III.3.1. Objetivo General

- Caracterizar fisiológicamente la respuesta de dos genotipos *C. papaya* L. Maradol y Silvestre ante un estrés por déficit hídrico y en recuperación.

III.3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar el comportamiento fisiológico de dos genotipos de *Carica papaya* Silvestre y Maradol, expuestas a diferentes tiempos de exposición y en recuperación después de establecer el riego.
- Evaluar y comparar la capacidad de respuesta de los dos genotipos ante un estrés déficit hídrico y en recuperación al estrés.

III.4. MATERIALES Y MÉTODOS

III.4.1. Material Vegetal

El material vegetal se obtuvo a partir de frutos colectados en diferentes localidades del Estado de Yucatán, el genotipo **Maradol** se obtuvo de una plantación comercial de papaya denominada “Rancho Tixcocab” ubicada en la localidad de Tixcocab, Yucatán ($20^{\circ}53'10''$ N $89^{\circ}27'7''$ O); y los frutos del genotipo **Silvestre** se obtuvieron en el Km 30 de la carretera Mérida – Valladolid, Yucatán ($20^{\circ}53'19''$ W $89^{\circ}21'13''$ O) (Figura III.1). Los frutos fueron transportados al Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), donde fueron lavados con detergente líquido y tratados con fungicida, los frutos fueron envueltos en papel y empacados a una temperatura de almacenamiento de 25°C para su maduración post-cosecha. La colecta se realizó el día 16 de Mayo de 2013, teniéndose un total de 12 frutos (Maradol) y 9 frutos (Silvestre).



Figura III.1. Mapa del Estado de Yucatán. Se indican los puntos de colecta del material biológico de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre (INEGI, 2013).

III.4.2. Determinación de peso y dimensiones de los frutos

Después de la maduración post-cosecha, se prosiguió a la caracterización de los frutos, evaluando parámetros de peso y dimensión del fruto, número promedio de las semillas y grosor de la pulpa. Con el uso de una balanza se determinó el peso fresco de los frutos colectados de cada genotipo. Para obtener las dimensiones de los mismos, se utilizó una regla graduada, se realizaron mediciones de: longitud máxima (L_{max}), diámetro máximo

(D_{max}), así como el grosor de la pulpa (cm). Las semillas de cada fruto fueron almacenadas en bolsas de papel y selladas para su posterior uso. Los resultados de la caracterización morfológica de los frutos colectados se presentan en el Anexo III.1.

III.4.3. Germinación de las semillas

A las semillas obtenidas de los frutos colectados, se les dio un tratamiento pre-germinativo en el invernadero del CICY, utilizando el protocolo reportado por Muñozcano y Martínez (2008), modificado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular, que consistió de los siguientes pasos:

1. Remojar las semillas por 72 h. Colocar las semillas en un vaso de precipitados con 200 mL de agua destilada, mantener en agitación y cada 24 h cambiar el agua.
2. Escurrir y colocar las semillas en franelas de 70 cm; previamente esterilizadas, doblar y colocar en una cámara de germinación acondicionada con luz artificial para mantener una T° de 35-37 $^{\circ}\text{C}$.
4. Riego y monitoreo de la franela humedeciéndola evitando la falta o exceso de agua hasta observar apertura de testa en más del 50% de las semillas.
5. Siembra de semilla germinada. Colocar cada semilla a 1 cm de profundidad en charolas de plástico (50 cavidades) utilizando como sustrato Peat moss (Sunshine). Para prevenir plagas del suelo se utilizó una solución de Carbendazim (0.5 mL L^{-1} de agua).

El riego consistió de 30 mL de agua cada tercer día durante los primeros 25 d, mientras que el tiempo restante, el riego fue de 50 mL cada segundo día. Se aplicó una solución nutritiva comercial (Bayfolan® Forte líquido, Bayer) (1 mL L^{-1}) dos veces por semana. La edad fisiológica con la que se trabajó en todos los experimentos fue de 70 d, tiempo en el que se tuvo suficiente número de hojas verdaderas para los análisis fisiológicos, que se llevaron a cabo en el estrato medio de las plantas, es decir en la 2° y 3° hoja completamente expandida contando desde la parte apical hacia abajo.

III.4.4. Experimentos

III.4.4.1. Caracterización del estrés por déficit hídrico.

Con el objetivo de caracterizar la respuesta fisiológica ante un estrés por déficit hídrico en dos genotipos de *C. papaya* Maradol y Silvestre, se realizó un primer experimento evaluando 6 tiempos de exposición al estrés que corresponden al número de días durante los cuales fue suspendido el riego. Los tiempos evaluados fueron: 0, 7, 14 y 21 d; además se incluyeron dos periodos de recuperación: 1 d y 7 d después de reanudado el riego (22 y 28 d). La finalidad de incluir dos periodos de recuperación, responde al hecho de que muchas de las afectaciones fisiológicas en ocasiones no son inmediatas o algunos de los parámetros fisiológicos no se encuentran tan afectados durante el periodo de recuperación.

A partir de las plantas previamente aclimatadas, se formaron 7 grupos de manera aleatoria (I-VII), en los que se midieron diferentes parámetros fisiológicos que indicaron el estado de estrés de la planta (Figura III.2).

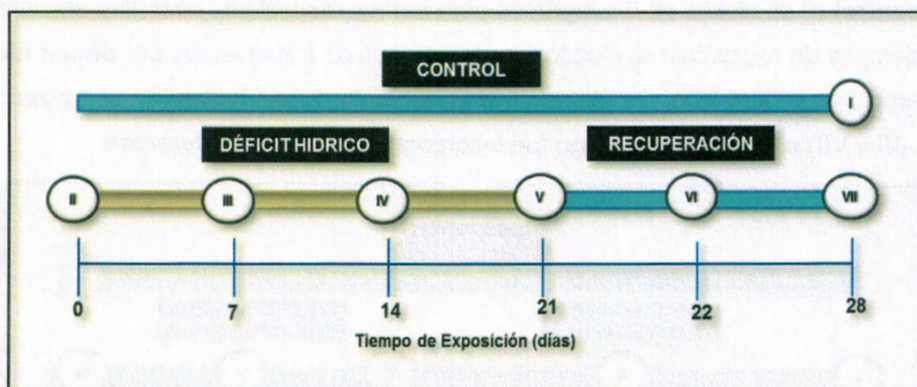


Figura III.2. Distribución de individuos de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, utilizadas en la caracterización de la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico.

La distribución de los grupos se realizó de la siguiente manera: con el grupo **control** (I) se formaron 6 subgrupos que fueron los controles para cada uno de los tiempos evaluados, los cuales se mantuvieron bajo condiciones de riego constante. Para los tratamientos por **déficit hídrico** se formaron 4 grupos (II-V), expuestos a diferentes periodos sin riego, por último en el tratamiento de **recuperación** se tuvieron dos grupos (VI y VII) en los cuales el

riego fue incorporado en dos tiempos diferentes. En total se realizaron tres repeticiones y para cada una se utilizaron 5 plantas, con un total de 45 plantas jóvenes de *C. papaya* por grupo distribuidas uniformemente de acuerdo a su tamaño. Los parámetros fisiológicos bajo los cuales se caracterizó la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico fueron: Abscisión de Hojas, Crecimiento Relativo ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Potencial Hídrico (Ψ_H), Fotosíntesis (P_n), Fluorescencia de Clorofila (F_v/F_m) y Fuga de Iones (%).

III.4.4.2. Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de *Carica papaya* Maradol y Silvestre.

Para evaluar la respuesta fisiológica de las plantas de *Carica papaya* a un punto máximo de estrés por déficit hídrico y a dos tiempos de recuperación, se analizaron los resultados previamente obtenidos en la caracterización de la respuesta al estrés por déficit hídrico y se precisó que los tiempos para evaluar la exposición al estrés en plantas jóvenes de *C. papaya* Maradol y Silvestre se acortarían a 3 tiempos: 0, 7 y 14 d; y dos periodos de recuperación de 1 d y 7 d después de incorporado el riego (15 d y 21 d) (Figura III.3). De esta forma, para este experimento se formaron 6 grupos (I-VI) de la siguiente manera: el grupo **control** (I) se dividió en 5 subgrupos para ser los respectivos controles en cada uno de los tiempos de exposición evaluados; en los grupos de tratamientos por **déficit hídrico** se tuvieron 3 grupos (II-IV) y por último en el tratamiento de **recuperación** se tuvieron dos grupos (V y VI) en los cuales el riego fue incorporado en tiempos diferentes.

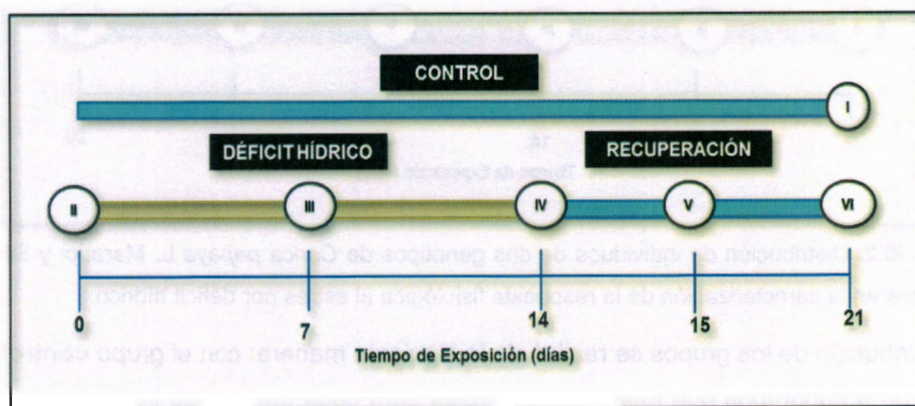


Figura III.3. Distribución de individuos dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, utilizadas en la evaluación de la exposición al estrés por déficit hídrico.

Se utilizaron plantas con una edad fisiológica de 70 d, previamente aclimatadas bajo condiciones de riego constante. Las mediciones se llevaron a cabo en el estrato medio de la planta, tomando hojas completamente expandidas. Los parámetros fisiológicos evaluados fueron: Potencial Hídrico (Ψ_H), Fotosíntesis (P_n), Densidad estomática (DE), Conductancia Estomática (g_s), CO_2 intercelular (C_i) y Transpiración (E).

III.4.5. Análisis Fisiológico.

III.4.5.1. Abscisión de Hojas

El rango de abscisión de hojas en plantas de *Carica papaya* Maradol y Silvestre se evaluó contabilizando la cantidad de hojas verdes totalmente expandidas que se encontraban unidas al tallo en cada tiempo analizado. Para este parámetro no se tomaron en cuenta los brotes de nuevas hojas o que tuvieran signos de senescencia, ya que para la medición de los parámetros fisiológicos éstos no son útiles.

III.4.5.2. Crecimiento Relativo ($mg \cdot mg^{-1} \cdot d^{-1}$)

Para evaluar el crecimiento relativo de las plantas se tomaron 3 plantas en cada uno de los tratamientos y su respectivo control. Se obtuvo el peso fresco de cada planta completa (raíz, tallo y hoja), posteriormente las muestras se envolvieron en papel aluminio y fueron liofilizadas hasta alcanzar un peso seco constante. Tomando ambos pesos y utilizando la ecuación de Hoffman: $RGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$; donde W_2 y W_1 corresponde al logaritmo natural transformado en los pesos de las plantas, y t_1 y t_2 a los tiempos evaluados; se determinó la tasa de crecimiento relativo entre los diferentes periodos de exposición (Hoffman y Poorter, 2002).

III.4.5.3. Potencial Hídrico (Ψ_H)

Para determinar el Ψ_H en hojas se utilizó un sacabocado de número 4 (0.1 cm de diámetro) para realizar cortes en forma circular (disco) en la parte suave de la hoja (evitando la nervadura central); por cada planta se sacaron 3 discos de una misma hoja, los cuales se transportaron en una cámara húmeda y se colocaron en cada una de las cámaras prismaticas C-52 Pyspro (WESCOR INC, Logan, USA), se dejaron 3 h como tiempo de equilibrio, concluidas éste tiempo se tomó la lectura de Potencial Hídrico (Ψ_H).

III.4.5.4. Fotosíntesis (Pn)

La tasa fotosintética de las hojas de *Carica papaya* se determinó utilizando un equipo portátil LICOR (LI 6400, Lincoln, Nebraska, USA) con la cámara para hoja de 6.25 cm². Las mediciones se llevaron a cabo bajo un flujo constante de aire de 200 μmol s⁻¹ y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 286 μmol m² s⁻¹. Para las mediciones se colocó a la hoja en la cámara y utilizando el programa pre-cargado en el equipo se esperaron 5 s para estabilizar la medición inicial y obtener las lecturas de: Fotosíntesis (Pn), Conductancia Estomática (g_s), CO₂ Intercelular (C_i) y Transpiración (E). Las mediciones fueron hechas durante la tarde (4:00-5:00 pm) con una temperatura promedio en la cámara para hoja de 23 ± 3 °C.

III.4.5.5. Densidad Estomática (DE)

La densidad estomática (DE) se obtuvo determinando, con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido (Jeol, modelo JSM-6360 LV), el número de estomas presentes en un campo de visión con un área de 0.02 cm², equivalente al diámetro del campo observado con un aumento de 250x. Se obtuvieron los promedios del conteo de cuatro muestras y la desviación estándar.

III.4.5.6. Fluorescencia de clorofila a (Fv/Fm)

Para medir la fluorescencia de clorofila en hojas, se utilizó un fluorómetro de clorofila (FMS 2 Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). Se sujetó el Leaf clip a una sola hoja, por cada planta, éste fue cerrado (adaptación a la oscuridad) durante 20 min. La exposición de luz fue en la parte adaxial de la hoja y consistió de un pulso de luz de 3000 μmol m⁻² s⁻¹ (100%) durante 2 s. Con estas lecturas se determinó el cociente de fluorescencia variable (Fv) sobre la fluorescencia máxima (Fm), Fv/Fm (Willits y Peet, 2001; Maxwell y Johnson, 2000).

III.4.5.7. Fuga relativa de iones (%)

La fuga de iones expresada en porcentaje fue calculada en base a los protocolos de Clarke *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2003; Bajji *et al.*, 2001, modificados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular. Se inició realizando cortes en forma circular (disco) en la parte suave de la hoja (evitando la nervadura) utilizando un sacabocado de número 7 (0.6

cm de diámetro), por cada planta se sacaron 3 discos de una misma hoja los cuales se colocaron en 12 mL de agua destilada. Se incubó y agitó por 4 h en un agitador orbital (velocidad 2.5) terminado este tiempo se midió la conductividad inicial (C_1) y se colocó en autoclave por 15 min, una vez que la muestra se enfrió a temperatura ambiente se midió la conductividad final (C_2). La fuga relativa de iones (%) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación: Fuga de iones = $(C_1/C_2) \times 100\%$.

III.5. RESULTADOS

III.5.1. Material vegetal

A continuación se presentan las condiciones de crecimiento a las cuales estuvieron expuestas las plantas durante el experimento: Caracterización del estrés por déficit hídrico. En la primera fase del tratamiento pre-germinativo se observó que después de 5 d de iniciada la apertura de la testa hubo un 20% de germinación y 3 d después se alcanzó un 50% de germinación en el genotipo Maradol y hasta un 80% en Silvestre. Las charolas fueron colocadas dentro del invernadero 2 del CICY, donde se dispuso una cámara de germinación protegida con una malla antiáfidos y cuyas condiciones ambientales fueron monitoreadas, con una humedad relativa del 70%, densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura promedio de 30°C (Figura III.4).

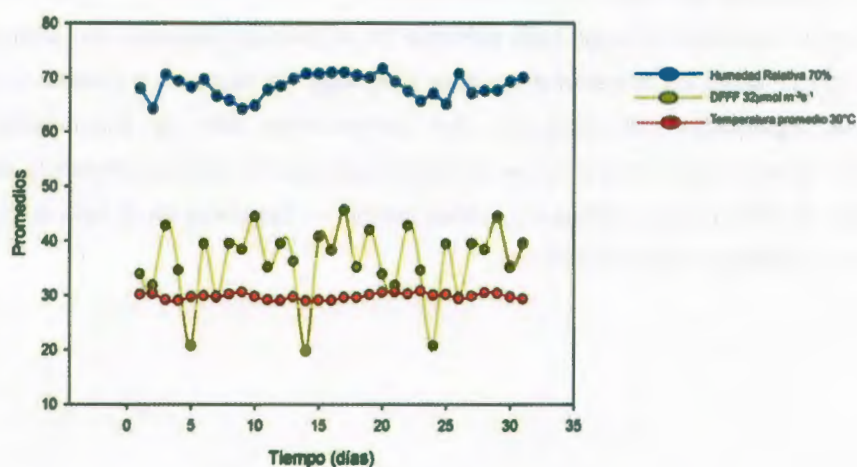


Figura III.4. Condiciones ambientales: Humedad Relativa (%), DFFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) registradas dentro de la cámara de germinación durante el experimento: Caracterización del estrés por déficit hídrico (Período: Septiembre-Octubre, 2013).

Una vez que las plantas alcanzaron una edad de 30 d y una altura aproximada de 13 cm fueron trasplantadas a bolsas de plástico para vivero (10 cm de diámetro y 18 cm de altura) con una mezcla de tierra: sustrato (3:1). Al alcanzar una edad de 65 d de edad fueron transferidas y aclimatadas durante 5 d en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ día/noche, fotoperiodo de 12 h, DFFF de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

III.5.2. Caracterización de la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico

Una vez que las plantas fueron expuestas al estrés por déficit hídrico, se documentaron y caracterizaron los cambios morfológicos, que a pesar de no ser indicadores estrictos del grado de estrés al que está expuesta la planta brindan información muy importante sobre su respuesta externa. En la secuencia fotográfica presentada en la Figura III.5, se observan los cambios en la morfología de las hojas de *C. papaya* Maradol y Silvestre, que para ambos casos fueron: curvatura, enrollamiento, amarillamiento y finalmente abscisión de las hojas con mayor edad, provocando que las plantas se quedaran con 1 o 2 hojas jóvenes en la parte superior del estrato al final del experimento. En ambos casos, estos cambios son notorios a partir del día 7 de iniciado el tratamiento y fueron más drásticos al día 21, tiempo en el cual las hojas presentaron una coloración amarilla y signos de marchitez, siendo la abscisión de hojas más evidente en el genotipo Maradol. En ambos casos, se observó que al día 28 de haber interrumpido el riego, las plantas no presentaron hojas totalmente expandidas, sin embargo, las senescentes aún se encontraban adheridas al tallo, que conservó mayor turgencia en el genotipo Silvestre a diferencia de Maradol en donde el 30% de las plantas evaluadas perdieron turgencia en el tallo al día 21 de iniciado el experimento por déficit hídrico.

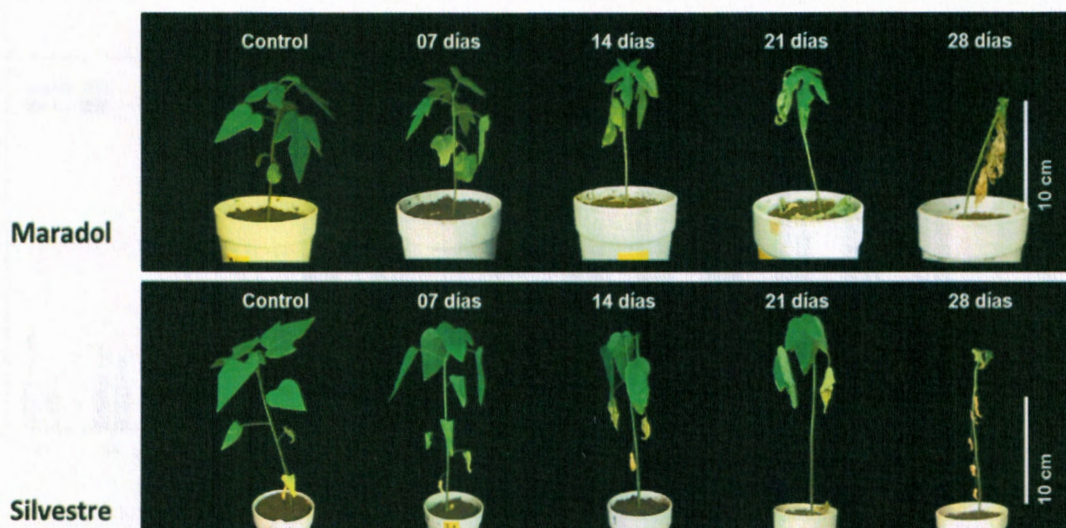


Figura III.5. Plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a un estrés por déficit hídrico a diferentes tiempos: planta control, 7 días sin riego, 14 días sin riego, 21 días sin riego y 28 días sin riego.

Otro rasgo morfológico registrado fue la abscisión foliar de cada grupo de plantas, con la finalidad de conocer cuál era la tasa de abscisión dependiendo del grado de estrés al que se encontraban expuestas y saber el número de hojas con que cuenta la planta para mantener los procesos de fotosíntesis dependiendo del grado de estrés. Los resultados obtenidos para las plantas control indican que en ambos genotipos el número de hojas se mantuvo significativamente constante con 8-7 hojas para Maradol y 9-8 hojas para Silvestre (Figura III.6A). Una vez que se suspendió el riego, se observó una disminución en el número de hojas en ambos genotipos a partir del día 7, siendo más evidente al día 14 de iniciado el tratamiento, con una abscisión foliar de hasta 80% en Maradol y tan sólo 50% en Silvestre, con diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura III.6B). Para el tiempo de estrés máximo (21 d), ambos genotipos tuvieron en promedio una hoja sin diferencias significativas. Finalmente, durante el periodo de recuperación el genotipo Silvestre mantuvo su número de hojas hasta el día 28 (1-2 hojas expandidas) en comparación con Maradol que siguió registrando una disminución en el número de hojas incluso después de reestablecido el riego.

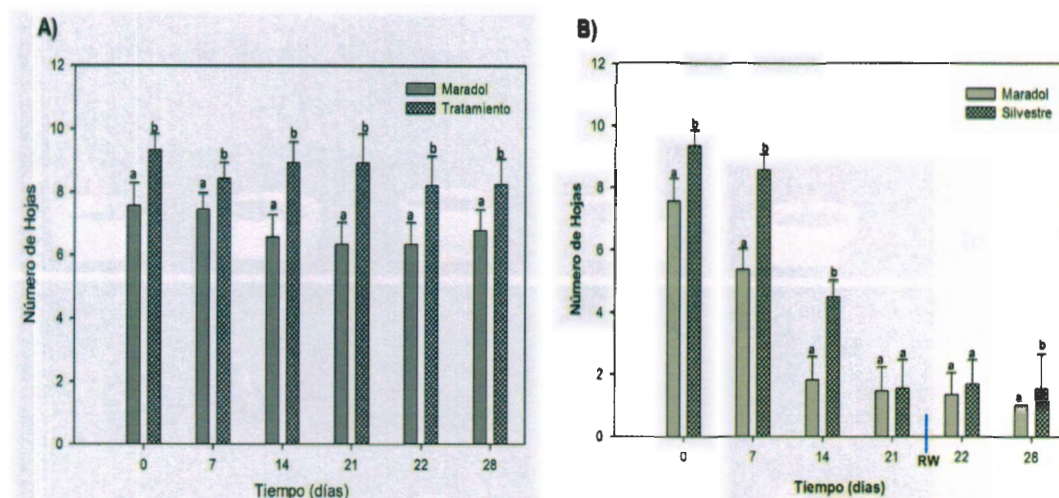


Figura III.6. Abscisión de hojas en dos genotipos de *Carica papaya* Maradol y Silvestre. **A)** Plantas Control. **B)** Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d) y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. En las plantas Control se mantuvo el riego normal (50 mL cada dos días). Los datos son el resultado de 3 plantas con 3 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW). Letras diferentes indican una diferencia significativa en cada tiempo de exposición.

Nuestros datos indican que las plantas Silvestre tienen un mayor número de hojas que las plantas Maradol. En general, las plantas del genotipo Silvestre sometidas a un estrés por déficit hídrico, en los diferentes tiempos, presentaron una menor caída de hojas que las plantas Maradol sometidas al mismo tiempo de estrés. Las plantas Silvestre después de 7 días de no riego, siguen conservando el mismo número de hojas que las plantas control, mientras que las plantas Maradol perdieron un mayor número de hojas en relación a las plantas control al día 7 con diferencias significativas. Después de 14 días de estrés, las plantas Silvestre tienen 4 hojas mientras las plantas Maradol solo tienen 2. Es decir, las plantas Silvestre pueden tolerar un periodo de déficit hídrico por un periodo de 7 días sin que se afecte el número de hojas en las plantas, mientras que las plantas Maradol pierden el 30% de sus hojas en este periodo de estrés. Después de 14 días sin riego las plantas Maradol pierden el 80% de sus hojas en promedio en relación a las plantas Silvestre que sólo pierden el 50% de sus hojas. Lo anterior, extrapolado a condiciones de campo puede

significar una pérdida importante de la biomasa necesaria para el aporte de fotosintatos a la planta y por ende una reducción en el rendimiento de la planta.

Muchos autores señalan que la altura, el número de hojas y flores por planta disminuyen a medida que se reduce el agua disponible en el suelo, al igual que el peso seco de la parte aérea (Okon, 2013; Qasem y Biftu, 2010). Para evaluar la afectación que tiene el estrés impuesto en la tasa de crecimiento de las plantas de papaya de ambos genotipos, se determinó la tasa de crecimiento relativo ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), calculado a partir de la diferencia del $\ln$ de su peso seco en los diferentes tratamientos. Adicionalmente, se documentaron diferencias en la longitud radical de las plantas expuestas al estrés por déficit hídrico de ambos genotipos.

A pesar de que los dos grupos tenían la misma edad fisiológica (90 d), el genotipo Silvestre presentó una longitud en la raíz mayor (6 cm) en comparación de Maradol (4 cm), esto para las plantas control. Para las plantas expuestas a 21 días de estrés por déficit hídrico la diferencia fue mayor, 18 cm para las plantas Silvestre y 10 cm para Maradol (Figura III.7). En general, el aumento en la longitud radical observada en ambos genotipos sugiere que ante una falta de agua en los tejidos, la planta es capaz de aumentar la longitud de la raíz pivotante en un periodo de 21 días, como respuesta al estrés. Sin embargo, el hecho de que el genotipo Silvestre haya alcanzado una longitud de tres veces su tamaño inicial, sugiere que las plantas Silvestre tienen mayor capacidad de buscar agua en el sustrato no así las plantas Maradol que tan sólo aumentaron dos veces su longitud inicial, lo que puede relacionarse a una menor capacidad de mantener la turgencia en los tejidos.

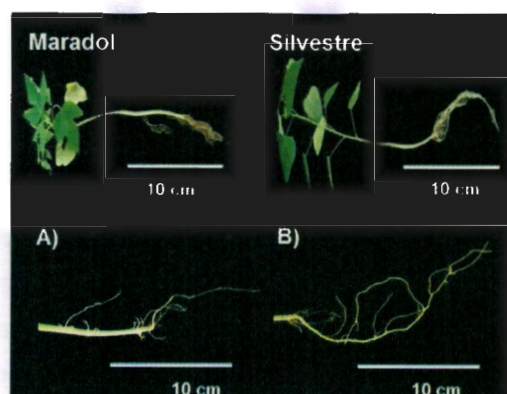


Figura III.7. Plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. Los incisos **A)** y **B)**, corresponden a plantas expuestas a un estrés por déficit hídrico de 21 días.

En la Figura III.8 se comparan los valores de crecimiento relativo (RGR) y se observa que en las plantas control la tasa de crecimiento relativo siguió un comportamiento ascendente durante el periodo experimental de 0.01 a 0.02 $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para el genotipo Maradol y de 0.02 a 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para el tipo Silvestre, alcanzando la mayor tasa de crecimiento a los días 7 y 14 (Figura III.8A). Sin embargo, una vez iniciado el tratamiento de estrés hídrico, la tasa de crecimiento se redujo abruptamente a un 20% para ambos genotipos comparado con los valores obtenidos en los controles, con el menor crecimiento en el periodo 7-14 días (Figura III.8B). Durante el tiempo de recuperación, se observó que la tasa de crecimiento aumentó a la semana de haber reestablecido el riego (28 d) para ambos tipos, sin embargo, fue más evidente para las plantas Silvestre con un aumento del 50% en la tasa de crecimiento, a diferencia de Maradol que sólo recuperó el 30% de su crecimiento en comparación a los controles. Estos resultados coinciden con lo registrado en la abscisión foliar (Figura III.6B), donde se vio que el genotipo Silvestre mantiene el número de hojas al final del periodo de recuperación.

Nuestros datos, reflejan que la mayor disminución en la tasa de crecimiento se registró 14 días después de suspender el riego en ambos genotipos, sin embargo, a los 7 días de reincorporado el riego, las plantas tienen el mismo valor de crecimiento que las plantas control en ambos casos. Esto resulta muy interesante debido a que durante un periodo de 7 días de estrés, este cultivo puede mantener su tasa de crecimiento sin que se vea

afectado. En el tiempo de recuperación la planta parece responder en función de su crecimiento relativo después de la aplicación del riego a los 7 días aún y después de sufrir un periodo de 14 días de estrés por déficit hídrico.

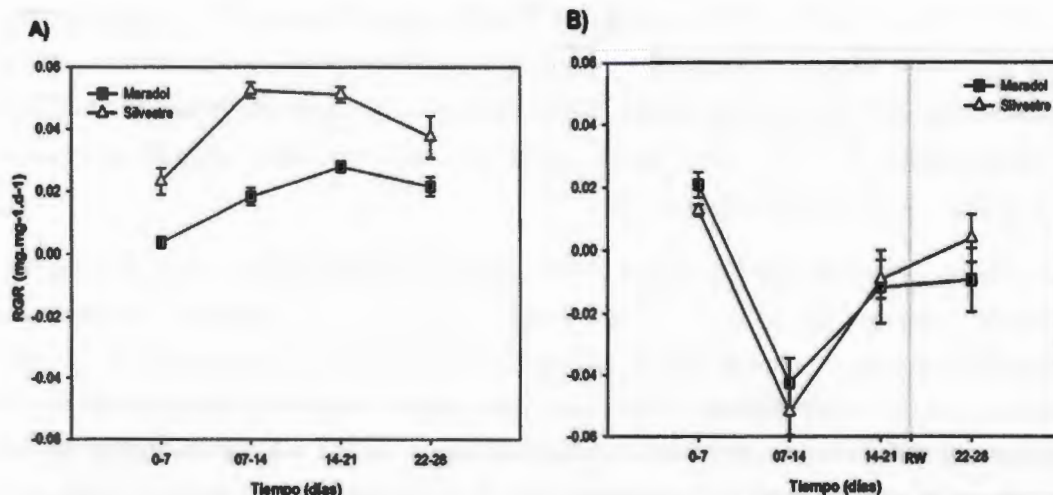


Figura III.8. Crecimiento Relativo $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ en plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. A) Control. B) Plantas expuestas a los diferentes periodos de tiempo sin riego (7, 14 y 21 d); y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. La tasa de crecimiento relativo (RGR) fue determinada utilizando la ecuación propuesta por Hoffman (2002) $\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$. Los datos son el resultado de 3 réplicas cada una. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cada tiempo de exposición.

El aumento en la tasa de crecimiento relativo al primer día de reincorporado el riego resulta inesperado si se considera que el número de hojas en este tiempo se mantuvo sin cambios para el genotipo Silvestre y en Maradol disminuyó, por lo que era de esperarse que la tasa de crecimiento se mantuviera sin cambios o disminuyera para el caso de Maradol. Sin embargo es necesario considerar que la longitud de la raíz fue mayor en las plantas Silvestre lo que puede influir en el cálculo de RGR, que para este estudio se calculó tomando en cuenta la planta completa. Para poder discernir si el aumento observado en los valores de crecimiento relativo se debe sólo al aumento en la longitud de la raíz y no a un error experimental es necesario calcular la tasa de crecimiento relativo para cada tejido.

III.5.2.1. Potencial Hídrico (Ψ_H)

El potencial hídrico foliar (Ψ_H) es utilizado como indicador del grado de estrés hídrico en las plantas. En este experimento se midió el potencial hídrico en hoja durante la mañana, para monitorear que las plantas control no tuvieran variaciones en el Ψ_H , indicativo que las plantas no estuvieron estresadas durante el experimento. En el caso contrario, en las plantas expuestas al estrés por déficit hídrico se midió el Ψ_H , para caracterizar y confirmar que las plantas en efecto, presentaran cambios en sus potenciales, indicativo del estrés ocasionado por la suspensión del riego.

Los datos obtenidos para los grupos control están representados en la Figura III.9A, se observa que el Ψ_H en las plantas control para los dos genotipos se mantuvo significativamente constante (-0.5 a -0.6 MPa) lo que indica que éste grupo de plantas tuvo a lo largo del experimento un potencial hídrico dentro de los valores indicativos de no estrés por déficit hídrico, reportados por la literatura (< 1 MPa), además de indicar que el riego en las plantas control fue el adecuado. Para las plantas expuestas al estrés por déficit hídrico, se observaron variaciones en el potencial del genotipo Maradol, no así en Silvestre, cuyo Ψ_H se mantuvo sin cambios significativos durante todo el experimento. Al día 7 de iniciado el tratamiento el potencial hídrico para Maradol fue de -0.6 MPa y al día 21 fue de -1.1 MPa. Finalmente, durante el periodo de recuperación el Ψ_H de Maradol registró valores estadísticamente similares a los de las plantas control, lo que indica que la planta es capaz de detectar un cambio en el Ψ_H y mantenerlo una vez que se ha aplicado el riego durante 7 días (Figura III.9B). Por el contrario, en las plantas Silvestre expuestas a los diferentes tratamiento de déficit hídrico, el Ψ_H se mantuvo en valores cercanos a -0.5 MPa, lo que indica que las plantas Silvestre no estuvieron expuestas al mismo nivel de estrés que Maradol. De igual forma, durante el periodo de recuperación no se obtuvieron valores estadísticamente diferentes en comparación a los registrados en las plantas control.

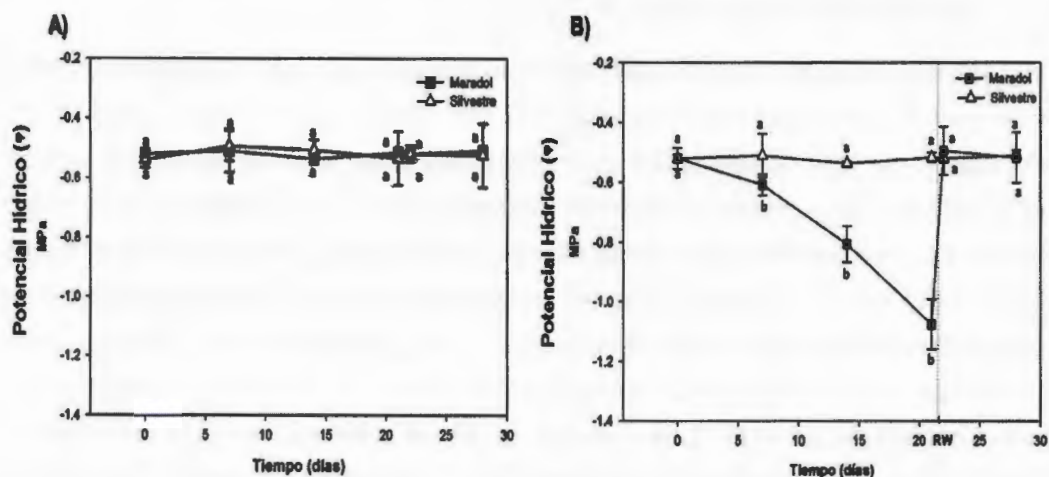


Figura III.9. Potencial Hídrico (MPa) en plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. A) Plantas control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.

Los datos obtenidos indican que las plantas Silvestre no tuvieron variaciones estadísticamente significativas durante todo el experimento, por el contrario Maradol registró valores de Ψ_H cercanos al Punto de Marchitez Permanente (PMP) de -1.5 MPa propuesto por diversos autores como el punto al cual las plantas no pueden recuperar la presión de turgencia incluso si se detiene toda la transpiración (Taiz y Zeiger, 2006). Bajo este concepto, se sugiere que la planta de *C. papaya* es tolerante al estrés por déficit hídrico. El hecho de que no se registraron cambios en el Ψ_H en el genotipo Silvestre, a pesar de no aplicar el riego por 7, 14 e incluso 21 días, sugiere que estas plantas son capaces de tolerar el estrés sin tener un cambio significativo en el potencial hídrico. Sin embargo, para descartar que este comportamiento se deba en efecto a un mecanismo del genotipo Silvestre a tolerar el estrés y no a errores en la estrategia experimental como la cantidad de sustrato utilizado o la hora en la que se realizó la medición; se consideró para el experimento subsecuente realizar las mediciones a la misma hora del día respetando el tiempo de equilibrio para cada lectura.

III.5.2.2. Fotosíntesis (Pn)

Una vez caracterizado el Ψ_H del suelo como un indicador del grado de estrés por déficit hídrico en la planta, se procedió a evaluar si este cambio en el potencial tenía alguna afectación en la tasa fotosintética. A partir de las mediciones de fotosíntesis realizadas en los grupos control de ambos genotipos se obtuvo la Figura III.10A, donde se observa que durante todo el experimento las plantas Maradol tuvieron valores mayores a Silvestre, con $3.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $2.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente; es posible que la variación en la tasa fotosintética se deba a las diferencias en la ontogenia de las hojas utilizadas. Para el caso del genotipo Maradol las hojas eran palmeadas con los lóbulos completamente definidos, característico de *Carica papaya* L. por el contrario las hojas Silvestre no estaban totalmente lobuladas, de hecho presentaban una forma corazonada, indicativo de que la hoja aún estaba en desarrollo, lo que puede llevar a variaciones en la tasa fotosintética.

Para los grupos expuestos a los tratamientos de déficit hídrico, se observó que aunque la tasa fotosintética en los individuos del genotipo Maradol fue mayor en el tiempo 0, respecto al Silvestre, una vez iniciado el tratamiento sus valores se redujeron significativamente a partir del primer día de suspendido el riego, alcanzando un valor de $0.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al día 21; en comparación con el genotipo Silvestre cuya tasa disminuyó progresivamente a partir del día 7 y tuvo un valor de $0.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al tiempo 21, valor significativamente mayor a lo obtenido por Maradol en ese mismo tiempo (Figura III.10B). Durante el periodo de recuperación, se observó que ambos genotipos aumentaron su tasa fotosintética a partir del primer día de reincorporado el riego en un 5%; sin embargo, al día 28 de recuperación Maradol no alcanzó los valores iniciales de fotosíntesis ($0.43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a diferencia de Silvestre, que logró alcanzar valores similares a los controles ($2.39 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

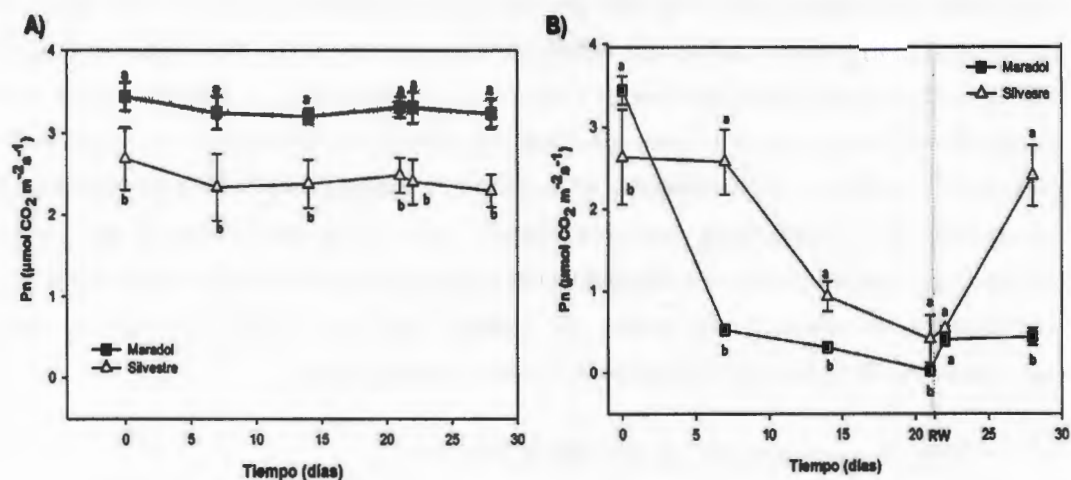


Figura III.10. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. **A)** Plantas control **B)** Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Para las plantas utilizadas como control se mantuvo el riego normal (50 mL cada dos días). Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.

Nuestros resultados señalan que las plantas pertenecientes al genotipo Silvestre tienen una afectación en la tasa de fotosíntesis a partir del día 7 de iniciado el tratamiento por déficit hídrico, caso contrario a lo observado en Maradol en donde los valores de fotosíntesis disminuyeron en los primeros días de suspendido el riego. Es decir, las plantas Silvestre pueden tolerar un periodo de 7 días de estrés por déficit hídrico, sin que éste afecte su tasa fotosintética. Por el contrario, las plantas Maradol después de 7 días sin riego reducen hasta en un 85% sus valores de fotosíntesis. Únicamente al día 14 de estrés las plantas Silvestre, son capaces de disminuir su tasa de fotosíntesis hasta alcanzar un valor de $1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y se mantuvo hasta el día 21 sin riego. Una vez iniciado el periodo de recuperación, las plantas Silvestre son capaces de responder a la rehidratación desde el primer día y a los 7 días su tasa de fotosíntesis es equiparable con una planta control, caso contrario a las plantas Maradol que no son capaces de alcanzar los valores iniciales de fotosíntesis. La capacidad de recuperación observada en ambos genotipos, nos indican que ambos son tolerantes al estrés por déficit hídrico impuesto. No

obstante, la rápida respuesta del tipo Silvestre a una rehidratación lo colocan como el genotipo más tolerante al estrés por déficit hídrico impuesto por 21 días. Esta capacidad de tolerancia puede relacionarse con el hecho de que a diferencia de Maradol, el genotipo Silvestre retiene un mayor número de hojas permitiéndole reestablecer los valores de fotosíntesis al primer día de reincorporado el riego. Y además puede correlacionarse con los valores de Ψ_H registrados, que para Silvestre se mantuvo sin cambios lo que se ve reflejado en una afectación significativamente menor en sus valores de fotosíntesis, en comparación a Maradol, en donde se observa que las variaciones de Ψ_H van acompañadas de una mayor afectación en su tasa de fotosíntesis.

III.5.2.3. Fluorescencia de clorofila a (Fv/Fm)

Al evaluar el parámetro de Fv/Fm en las plantas jóvenes de 90 d pertenecientes al grupo control, se observó una cifra constante para ambos genotipos durante todo el experimento con valores cercanos a 0.84, que indican que el fotosistema II (PS II) está íntegro y tiene un uso altamente eficiente de la energía de excitación en el proceso fotoquímico (Mohamed *et al.*, 1995) (Figura III.11A). Por el contrario en las plantas expuestas a los tratamientos de estrés hídrico, el valor de Fv/Fm disminuyó de manera progresiva hasta el día 21 (tiempo máximo de estrés) donde alcanzaron valores de 0.80 y 0.78 para las plantas Maradol y Silvestre respectivamente. En la Figura III.11B, se observa que durante el periodo de recuperación el genotipo Maradol mantuvo una Fv/Fm de 0.79 hasta el término del experimento, por otra parte, las plantas Silvestre alcanzaron una Fv/Fm de 0.81 al mismo tiempo, lo que sugiere una mayor capacidad de recuperación. No obstante, al realizar los análisis estadísticos no se registraron diferencias significativas entre los grupos control y tampoco entre los tratamientos.

Nuestros datos indican que mediante el análisis de Fv/Fm no es posible determinar el grado de afectación debido al estrés por déficit hídrico tanto en las plantas Maradol como en las Silvestre, ya que al aplicar el estrés por déficit hídrico y durante el tiempo de recuperación no se obtuvieron valores estadísticamente significativos en los diferentes tiempos. Los datos indican que el estrés por déficit hídrico no causa un daño al PII en los primeros 21 días de iniciado el tratamiento por lo que la afectación que se observa en la tasa de fotosíntesis se debe más a la disminución en la biomasa y no a un daño en el aparato fotosintético, como lo demuestran los valores de Fv/Fm obtenidos.

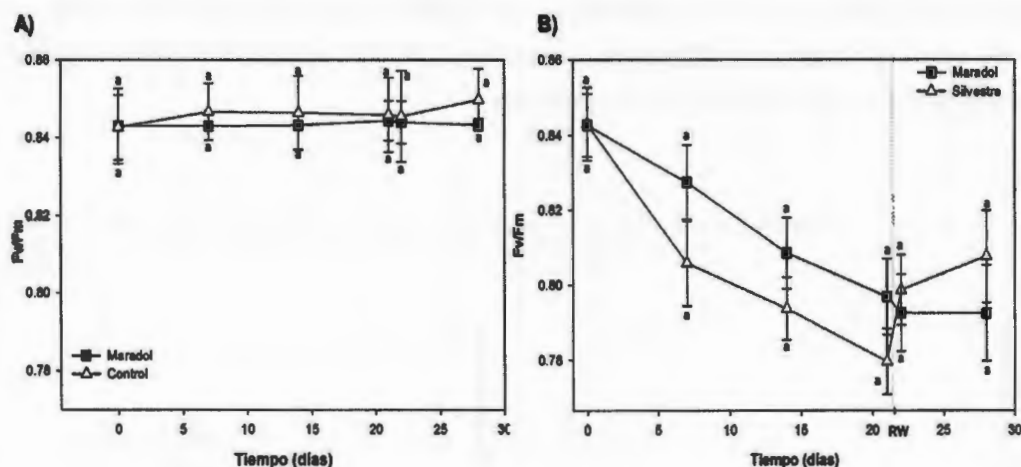


Figura III.11. Fluorescencia de clorofila (F_v/F_m) en plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. A) Plantas control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. En las plantas utilizadas como control se mantuvo el riego normal (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.

III.5.2.4. Fuga de electrolitos (%)

La fuga de electrolitos es un indicador del daño en la membrana, los resultados obtenidos para los grupos control están representados en la Figura III.12A. En la gráfica se observa que el porcentaje de fuga de electrolitos para los grupos control de ambos genotipos fue del 25% durante todo el experimento sin diferencias significativas entre los grupos. Por otra parte, los resultados obtenidos en los grupos expuestos a los tratamientos por déficit hídrico indican que para ambos casos la afectación a nivel membrana ocurre durante los primeros días de exposición al estrés por déficit hídrico (Figura III.12B). Al día 7 de interrumpido el riego, el % de fuga de electrolitos fue mayor para las plantas Maradol con 36% en comparación con Silvestre que tuvo una afectación de tan sólo un 29% con diferencias significativas. Al día de estrés máximo (21 d) el % de fuga de electrolitos para las plantas Maradol fue de 50%, por el contrario para Silvestre fue de tan solo 36%. Interesantemente, una vez que se reincorporó el riego durante una semana, el porcentaje de fuga de electrolitos disminuyó en ambos casos. Aunque en el caso de las plantas

Maradol el % de fuga de iones disminuyó en un 5%, no se alcanzaron los valores del grupo control a diferencia de Silvestre, que presentó valores comparables a los obtenidos en las plantas control al día 28 de recuperación.

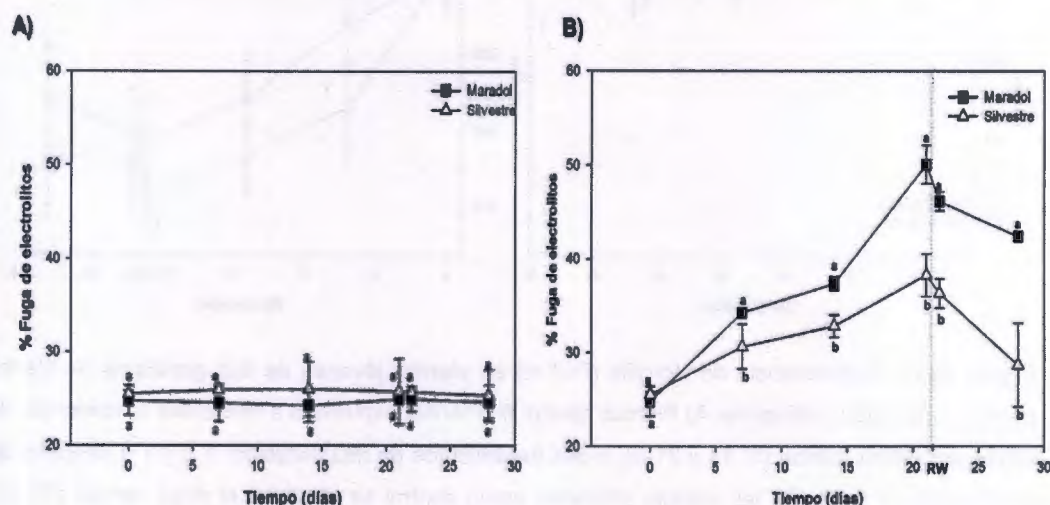


Figura III.12. Fuga de electrolitos (%) en plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. A) Plantas Control B) Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (7, 14 y 21 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.

Los datos obtenidos indican que para ambos genotipos, el % de fuga de iones incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición al estrés por déficit hídrico, lo que indica una correlación positiva entre el nivel de estrés por déficit hídrico y el daño en membrana. De igual forma, se observó que el daño en membrana fue significativamente mayor para el genotipo Maradol tanto en el periodo de déficit hídrico como en el de recuperación. Lo que indica que la membrana de las plantas Maradol es más susceptible en comparación de Silvestre, donde se observó que una vez de reincorporado el riego se disminuyó el daño en membrana.

En base al análisis de los resultados presentados en este apartado, se estableció el día 14 como el tratamiento máximo de estrés al que las plantas de *C. papaya* presentan

mayores diferencias significativas en los parámetros analizados, además los cambios en el potencial hídrico en este tiempo son un indicador importante del grado de estrés al que está sometida la planta en este tiempo.

III.5.3. Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre

En base a los resultados obtenidos del apartado anterior, para este segundo experimento se obtuvo un nuevo lote de plantas siguiendo el esquema señalado en la Figura III.3, además, se utilizaron plantas con una edad de desarrollo similar de 90 días. Se procedió a caracterizar las respuestas fisiológicas y morfológicas de las plantas de dos genotipos de *C. papaya* Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico (0, 7 y 14 d) y dos periodos de recuperación (1 y 7 d). Los cambios morfológicos documentados en este experimento son consistentes con lo reportado en el ensayo anterior (III.5.2) y fueron: curvatura, enrollamiento y finalmente abscisión de las hojas con mayor edad.

Al inicio del experimento las plantas tenían en promedio de 8-6 hojas para el caso del genotipo Maradol, mientras que para Silvestre fue de 9-7 hojas. Durante el experimento se observó que la abscisión en las plantas Maradol ocurrió en los primeros 7 días después de suspender el riego, mientras que para Silvestre ocurrió en los días posteriores. Al final del experimento, en ambos casos las plantas tuvieron en promedio un total de 2 a 3 hojas totalmente expandidas. Los cambios morfológicos empezaron a ser notorios en ambos genotipos a partir del día 7, donde se observó la inclinación y enrollamiento de las hojas y empezaron los signos de abscisión foliar. De nueva cuenta se observó una pérdida en la turgencia del tallo en 20% de los individuos que conformaban el grupo Maradol. Interesantemente, en ambos genotipos se observó que después de 1 semana de reincorporado, las hojas recuperaron su turgencia al igual que el tallo (Figura III.13).

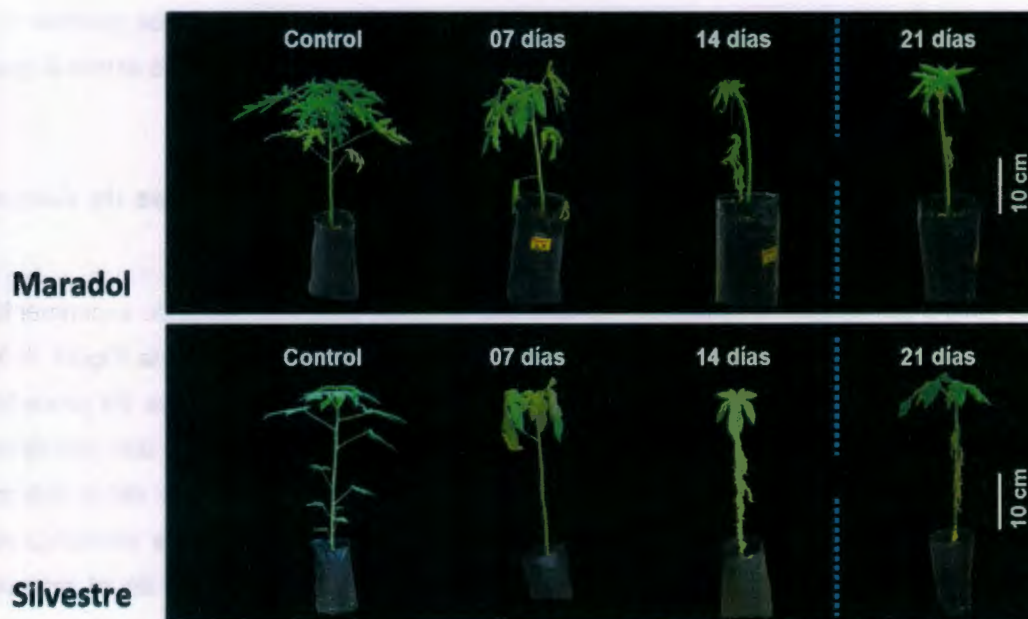


Figura III.13. Plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a estrés por déficit hídrico a diferentes tiempos sin riego: Planta control, 7 días sin riego y 14 días sin riego. Y un periodo de recuperación de 21 días. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento.

Los datos obtenidos confirman que las plantas pertenecientes al genotipo Silvestre poseen un mayor número de hojas en comparación a las plantas Maradol. Adicionalmente, se confirmó que las plantas Silvestre expuestas a un estrés por déficit hídrico presentan una tasa menor de abscisión en comparación a Maradol y se ve reflejado en su capacidad de recuperar su tasa fotosintética al primer día después de reincorporado el riego.

III.5.3.1. Potencial Hídrico (Ψ_H)

El potencial hídrico foliar (Ψ_H) es utilizado como indicador del grado de estrés por déficit hídrico en las plantas, por lo tanto en este experimento se midió el Ψ_H en el tejido de hoja con el objetivo de: 1. Monitorear que las plantas control no estuvieran estresadas por un riego incorrecto y 2. Confirmar que las plantas expuestas al estrés presentarán cambios en el potencial hídrico en respuesta a la suspensión del riego.

Los datos obtenidos para los grupos control están representados en la Figura III.14A, en la gráfica se observa que el Ψ_H registrado en las hojas de plantas control de los dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre fue de aproximadamente -1.0 MPa durante todo el experimento sin diferencias significativas. El valor de Ψ_H obtenido en las plantas control, se encuentra dentro de los valores (-0.5 a -1 MPa) considerados indicadores de que las planta se encuentra en condiciones de riego adecuadas.

Por otra parte, una vez iniciado el tratamiento por déficit hídrico se observaron cambios en el Ψ_H en respuesta a la poca disponibilidad de agua en el sustrato. Al día 7 sin riego, los potenciales disminuyeron a -1.3 MPa en Maradol y -1.2 MPa en Silvestre, sin diferencias significativas. Al día 14 se registraron los valores más negativos de Ψ_H , con -1.8 para Maradol y tan sólo -1.4 MPa para Silvestre. Durante el periodo de recuperación, ambas plantas tuvieron la capacidad de aumentar el Ψ_H al primer día de haber aplicado el riego y a la semana de reincorporado el riego, ambos genotipos fueron capaces de aumentar su Ψ_H alcanzando los valores iniciales (Figura III.14B).

Los datos obtenidos, sugieren que la planta no sólo es capaz de detectar la poca disponibilidad de agua en el suelo durante los primeros días de iniciado el tratamiento por déficit hídrico, sino que además, es capaz de diferenciar los cambios en el Ψ_H del suelo una vez que el riego es reincorporado, lo que se ve reflejado en un aumento en los valores del Ψ_H en el tejido de hoja, durante los primeros días de reincorporado el riego. A diferencia de lo observado en el ensayo anterior (III.5.2.1.), en este nuevo experimento se observaron cambios en los potenciales de los dos genotipos en respuesta al estrés impuesto. Lo que indica que ambos genotipos estuvieron expuestos a un estrés ocasionado por la falta de riego, sin embargo los valores de Ψ_H fueron menos negativos para el caso del genotipo Silvestre, a diferencia de Maradol, lo que sugiere que a pesar, de que las condiciones de estrés fueron las mismas, la afectación en los valores de Ψ_H fue estadísticamente mayor en el genotipo Maradol. Es interesante señalar que los valores de Ψ_H alcanzados al día máximo de estrés, son cercanos al valor del PMP e incluso mayores para el caso del genotipo Maradol, esto pone de manifiesto que bajo este concepto, las plantas de *Carica papaya*, pueden considerarse como una planta tolerante al estrés por déficit hídrico y que además es capaz de percibir un cambio en el Ψ_H del suelo ante un estrés por déficit hídrico.

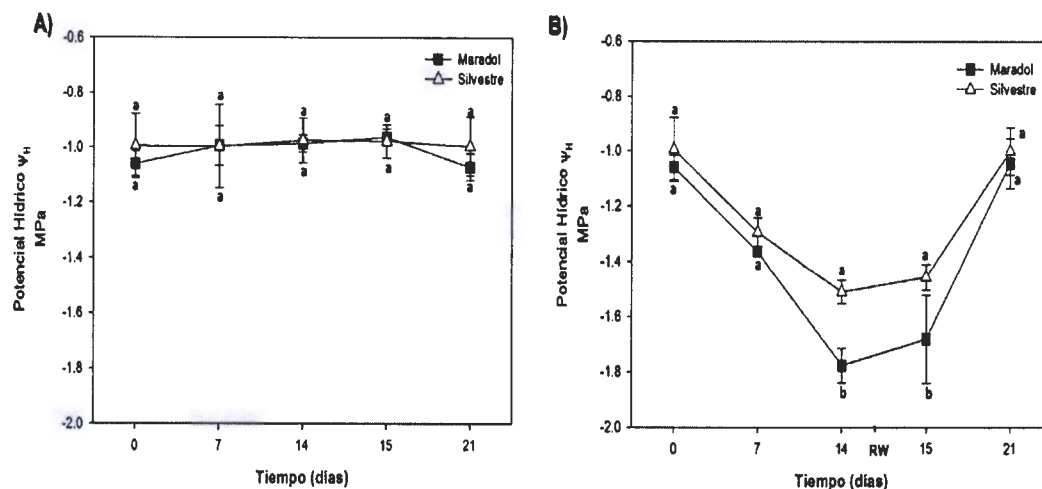


Figura III.14. Potencial Hídrico (MPa) en plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. **A)** Control **B)** Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (0, 7 y 14 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego (50 mL cada dos días) durante todo el tratamiento. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.

III.5.3.2. Fotosíntesis (P_n), Conductancia Estomática (g_s), CO_2 Intercelular (C_i) y Transpiración (E)

El estrés por déficit hídrico afecta las funciones de las plantas, así como su eficiencia para absorber el CO_2 y transformar la radiación fotosintéticamente activa durante el proceso fotosintético en biomasa (Acosta-Díaz, 2009). En nuestro estudio, se caracterizó el sistema de plantas de *C. papaya* de dos genotipos (Maradol y Silvestre), de 90 días de edad expuestas a un estrés por déficit hídrico, con variaciones en el Ψ_H en respuesta al estrés. Los resultados obtenidos de la medición del intercambio de gases en este experimento se encuentran representados en la Figura III.15.

El primer parámetro evaluado corresponde a la tasa de fotosíntesis (**A**), en la gráfica se observa que al día 0, ambos genotipos registraron valores cercanos a $6 \mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$ sin diferencias significativas; y una vez iniciado el tratamiento sin riego, la tasa fotosintética de ambos descendió progresivamente hasta registrar valores

estadísticamente similares de $1.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al día 14. El decremento en la tasa fotosíntesis sugiere un daño en el sistema fotosintético debido al estrés por déficit hídrico, no obstante, una vez que inicia el periodo de recuperación al día 15, los valores de fotosíntesis para el genotipo Silvestre aumentan alcanzando los valores iniciales al día 21 de recuperación, a diferencia de Maradol que no alcanza estos valores.

La conductancia estomática (gs) (**B**) en ambos casos inició con valores similares de $0.25 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una vez suspendido el riego disminuyó, conforme aumentó el tiempo de exposición, alcanzando los valores más bajos al día 14, que para ambos casos fue de ($0.002 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sin diferencias significativas. Durante el periodo de recuperación el genotipo Silvestre incrementó sus valores de gs al día de reincorporado el riego ($0.05 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a diferencia de Maradol que aumentó progresivamente sus niveles de gs durante los 7 días siguientes de rehidratación hasta alcanzar un valor de ($0.17 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) al día 21, significativamente menor al $0.25 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ reportado para Silvestre.

El siguiente parámetro evaluado fue la cantidad de CO_2 intercelular (Ci), en la gráfica (**C**), se observa que la tasa de Ci fue similar para ambos genotipos al tiempo 0, con un valor de $300 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, y una vez eliminado el riego, al tiempo 14, se tuvieron los valores más bajos, siendo significativamente menores el genotipo Maradol ($50 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) en comparación a Silvestre con $100 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. De nueva cuenta, durante el periodo de recuperación el genotipo Silvestre respondió al primer día de aplicado el riego, incrementando la tasa de Ci hasta alcanzar los valores iniciales al día 21. Por el contrario el genotipo Maradol incrementó progresivamente la tasa de Ci durante la semana de recuperación hasta alcanzar valores significativamente similares a los registrados para Silvestre ($290 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$).

Por último, se presenta la tasa de transpiración (**D**) en donde se observó que ambos genotipos tuvieron valores similares ($3.5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) al tiempo 0. A los 7 de iniciado el tratamiento sin riego se alcanzaron en ambos casos, valores mínimos de transpiración cercanos a $0.005 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sin diferencias significativas, estos valores se mantuvieron sin cambios hasta el día 14 en que se aplicó el riego nuevamente. Una vez aplicado el riego, las plantas Silvestre aumentaron su tasa de transpiración a partir del segundo día de aplicado el riego. Al final del experimento, se observó que la tasa de

transpiración para Silvestre fue significativamente mayor ($3.5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a diferencia de Maradol ($3 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

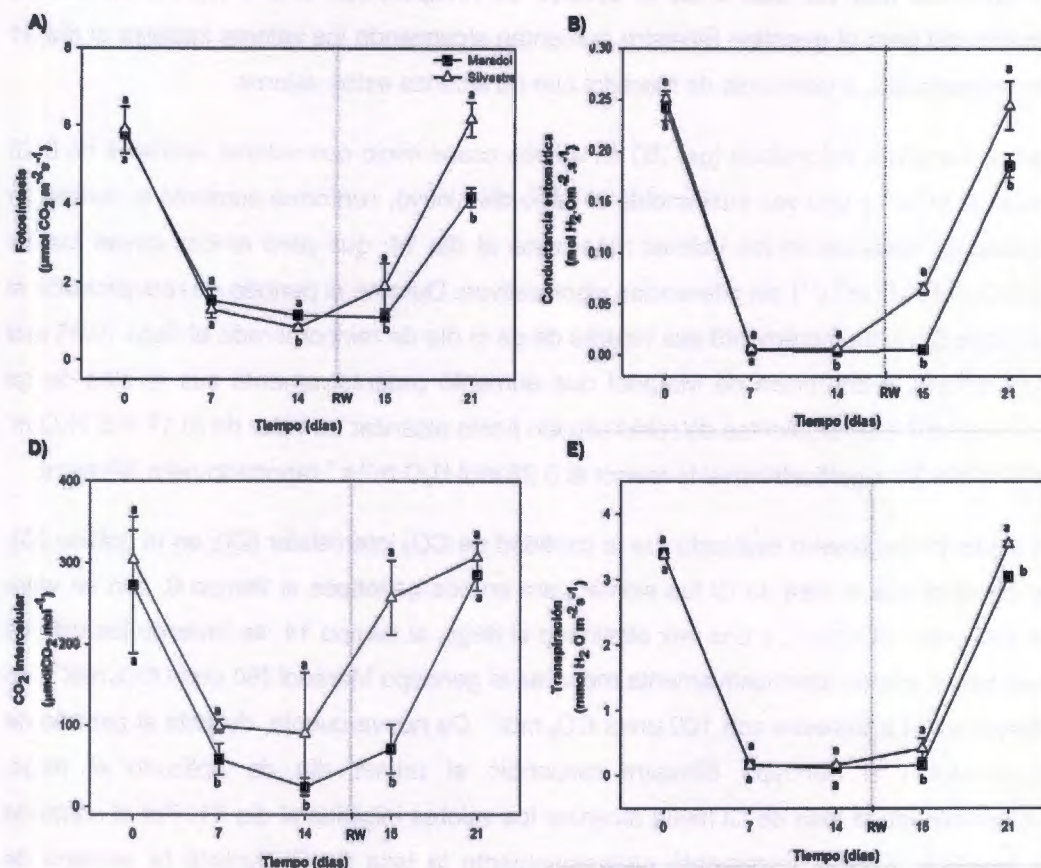


Figura III.15. Intercambio de gases en hojas de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, bajo estrés por déficit hídrico a diferentes períodos sin riego (0, 7 y 14 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego. **A)** Fotosíntesis, **B)** Conductancia estomática, **C)** CO_2 intercelular y **D)** Transpiración. Los datos son el resultado de 3 plantas con 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre cada tiempo de exposición.

Nuestros datos de Fotosíntesis (P_n) coinciden con lo reportado previamente en el apartado III.5.2.2., en donde se observó que los dos genotipos son capaces de tolerar el estrés por déficit hídrico en función de su tasa fotosintética. Sin embargo, una vez que se inicia con el periodo de recuperación, el genotipo Silvestre es capaz de reestablecer su

maquinaria fotosintética, lo que le permite alcanzar al día 21 los valores iniciales de P_n , no así, para Maradol. Para el caso de la Conductancia estomática (g_s), se observó en ambos casos, una reducción en los valores de g_s , sin embargo, la respuesta inmediata de las plantas Silvestre al aplicar el riego, sugiere un control eficiente sobre la apertura y cierre de estomas, caso contrario a lo observado en Maradol, en donde la respuesta se dio de manera paulatina a partir del segundo día de aplicado el riego. El comportamiento observado en la tasa de CO_2 intercelular (C_i), indican que éste valor guarda una correlación negativa con la g_s , lo que indica que a pesar de que los estomas se cierran, el nivel de C_i se mantiene disponible en la planta. Finalmente la tasa de transpiración (E), presenta un comportamiento muy interesante en los tiempos 7 y 14, días en los cuales se registran los valores más bajos de E y se mantienen sin cambios. Ésta observación, sugieren que al día 7 de iniciado el tratamiento sin riego, la planta cierra completamente sus estomas con la finalidad de reducir la pérdida de agua por transpiración y se mantiene así hasta el momento en que es aplicado nuevamente el riego. Respuesta que es más evidente en el genotipo Silvestre, lo que confirma su capacidad de tolerar un estrés por déficit hídrico y recuperar los valores iniciales de varios parámetros fisiológicos.

III.5.3.3. Densidad Estomática (DE)

Para correlacionar los resultados obtenidos de las mediciones de intercambio de gases, se cuantificó la densidad estomática en las hojas de ambos genotipos contabilizando el número total de estomas en un campo de visión de 0.02 cm^2 , mediante las imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Adicionalmente, las observaciones realizadas en el Microscopio Óptico indican que *Carica papaya* L. es una especie hipoestomática, que presenta la mayoría de sus estomas en la parte abaxial. Los estomas son de tipo anomocítico, sin células anexas; es el más frecuente en dicotiledóneas y también el más antiguo (Perven *et al.*, 2007) (Anexo III.2).

Los promedios obtenidos de la cuantificación del número de estomas al tiempo 0 indican que el genotipo Silvestre posee mayor DE con 89 estomas en comparación de Maradol con 68. Por otra parte, en el tratamiento máximo de estrés no hubo variación en el número de estomas para ninguno de los genotipos; finalmente, en el periodo de recuperación de 28 días hubo una disminución en el número de estomas en ambos genotipos, con 49 estomas para las plantas Maradol y 70 para Silvestre (Figura III.16A).

Adicionalmente, se graficó el tamaño promedio (μm) de 5 estomas para cada tiempo evaluado (Figura III.16B). En general, los datos indican que los estomas de las plantas Maradol tienen una mayor longitud con un promedio de $10.1 \mu\text{m}$, por el contrario en las plantas Silvestre el tamaño de los estomas es menor con un largo de $6.5 \mu\text{m}$ en promedio con diferencias significativas. Es importante señalar que similar a lo observado en la DE, en ambos casos, la longitud del estoma no cambió durante el tiempo 0 y al tiempo máximo de estrés (21 d), sin embargo en el periodo de recuperación, hubo una reducción en la longitud del estoma de ambos genotipos.

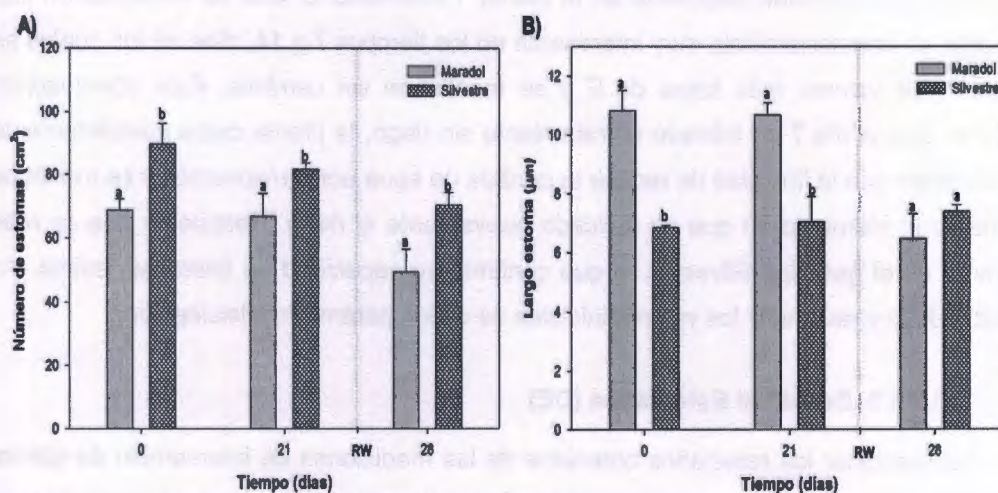


Figura III.16. Efecto del estrés por déficit hídrico sobre la A) densidad estomática, y B) largo del estoma en plantas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (0 y 21 d) y un tratamiento de recuperación de 7 días (28 d) después de restablecido el riego. Los datos son el resultado de 5 réplicas. Se señala el punto de rehidratación (RW). Letras diferentes indican una diferencia significativa en cada tiempo de exposición.

La transpiración y la respiración están en función directa con el número y apertura estomática y como las hojas son los principales órganos donde se realiza la fotosíntesis, la cantidad y distribución de los estomas influyen directamente sobre la asimilación de CO_2 (Ruiz *et al.*, 1962). Nuestros resultados, indican que la DE es mayor en el genotipo Silvestre con un promedio de 89 al día 0 en comparación con los 68 de Maradol, sin embargo al analizar su tamaño, se observó que los estomas de Maradol son más grandes ($10.1 \mu\text{m}$) en comparación de Silvestre ($6.5 \mu\text{m}$), lo que sugiere que hay una relación

entre el tamaño y número de estomas, lo que se ve reflejado en la tasa de transpiración que fue similar para ambos genotipos (Figura III.15D).

Tomando en cuenta los valores de potencial hídrico en hoja que ha sido utilizado como indicador del grado de estrés hídrico al que están expuestas las plantas y el parámetro de fotosíntesis, que tuvo mayor variación durante todos los tratamientos analizados en ambos genotipos de *Carica papaya* L.; se construyeron los siguientes diagramas de dispersión (Figura III.17). En el caso de Maradol (A) se obtuvo una R de 0.8708 y para Silvestre de 0.9819 (B), lo que pone de manifiesto una fuerte correlación entre el valor de fotosíntesis y el potencial hídrico; es decir cuando la planta alcanza potenciales hídricos más positivos en hoja, la tasa de fotosíntesis también incrementa; por el contrario en potenciales hídricos negativos, como los registrados durante el estrés por déficit hídrico, los valores de la tasa de fotosíntesis también disminuyen.

Esta correlación se repite con los valores obtenidos en el experimento: caracterización del estrés hídrico (III.5.2), donde se vio que potenciales más negativos no sólo estaban relacionados con una afectación en la tasa de fotosíntesis, sino por el contrario, la afectación fue visible en varios parámetros como la disminución en la tasa de crecimiento relativo y un aumento en el porcentaje de fuga de electrolitos siendo significativamente mayor en Maradol. En 1970, Boyer, midió diferentes potenciales hídricos en hojas y los comparó con los rangos de fotosíntesis en diferentes especies vegetales: maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*) y flores de girasol (*Helianthus annuus*), para éstas tres especies el rango de fotosíntesis disminuyó conforme el potencial hídrico en las hojas aumentaba.

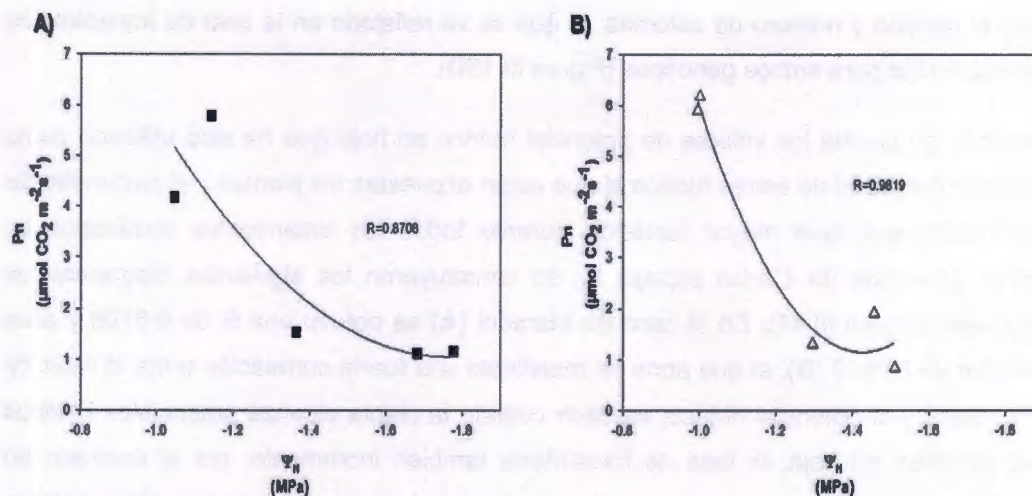


Figura III.17. Correlación polinomial cuadrática entre los valores de fotosíntesis y potencial hídrico para plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol (A) y Silvestre (B) expuestas a tratamientos de estrés por déficit hídrico (0, 7 y 14 d), y dos tratamientos de recuperación: 1 d y 7 d después de restablecido el riego.

Nuestros resultados, ponen de manifiesto que la imposición de estrés por déficit hídrico se acompaña por una reducción en los valores de Ψ_H conforme aumenta el tiempo de exposición al estrés, lo que indica que la planta es capaz de detectar el cambio en el Ψ_H del suelo, que genera cambios a nivel morfológico y fisiológico en ambos genotipos. El primer cambio observable es la abscisión foliar, que reduce significativamente la biomasa de la planta. En nuestro sistema, la abscisión fue mayor en las plantas Maradol, por el contrario las plantas Silvestre retardan la caída de sus hojas por un periodo más largo, permitiendo mantener su tasa fotosintética por más tiempo, aún en condiciones de estrés.

De acuerdo con los valores obtenidos de Fv/Fm, se observó que a pesar del estrés por déficit hídrico impuesto, no existe un daño en el PSII, lo que sugiere que la disminución que en la tasa de fotosíntesis observada en ambos genotipos se debe a la reducción en el número de hojas disponibles para llevar a cabo las reacciones de fotosíntesis y no a un daño en el aparato fotosintético. Finalmente, el comportamiento observado durante el periodo de recuperación, indica que ambos genotipos son capaces de detectar el cambio en el Ψ_H del suelo una vez que se ha aplicado el riego, lo que no sólo se ve reflejado en el

aumento del Ψ_H en las hojas, sino que además, permite la recuperación de los valores iniciales de varios de los parámetros fisiológicos analizados.

En este sentido, se observó que el genotipo Silvestre tiene una mayor capacidad de recuperación en comparación de Maradol, lo que indica que los mecanismos de adaptación presentes en las plantas Silvestre que la hacen más tolerante al estrés por déficit hídrico no están presentes de igual forma en Maradol, producto quizás de la domesticación a la que ha sido sometida.

III.6. DISCUSIÓN

III.6.1. Caracterización del punto de estrés por déficit hídrico

Para caracterizar la respuesta fisiológica de las plantas de *Carica papaya* ante un estrés por déficit hídrico, se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos y morfológicos que nos permitieron caracterizar nuestro modelo de estudio y dieron información importante sobre el comportamiento que tienen los dos genotipos de *C. papaya* evaluadas durante el estrés por déficit hídrico y durante un periodo de recuperación. De manera general, la literatura reporta que entre las respuestas de *C. papaya* a un estrés por déficit hídrico está el posponer o evitar la deshidratación mediante una regulación estomática estricta, reparación de la cavitación y un ajuste osmótico intenso (Mahouachi *et al.*, 2006; Marler, 1998). Este comportamiento fue observado en ambos genotipos al aumentar los valores de Ψ_H , producto de la falta de riego, que se vio reflejado en una afectación de la mayoría de los parámetros evaluados: abscisión de hojas, crecimiento relativo, fotosíntesis, Fv/Fm y % de fuga de electrolitos.

El crecimiento puede definirse como un alargamiento celular irreversible (Kirkham, 2011). En 1976, Hsiao *et al.*, propusieron que el crecimiento celular es probablemente el proceso más sensible al déficit hídrico, porque al disminuir la presión de turgencia en los tejidos, también lo hace el alargamiento celular e incluso llega a detenerse cuando el potencial hídrico se reduce en 0.3-0.4 MPa en toda la planta. Esto se refleja en una marcada reducción del área foliar la cual también es acentuada por el aceleramiento en la tasa de senescencia (Rivero *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos de la medición de la tasa de crecimiento relativo indican que para ambos casos el crecimiento se ve mermado en un 20% conforme aumenta la exposición del estrés y vuelve a incrementar durante el periodo de recuperación; este comportamiento ha sido documentado en estudios previos realizados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular evaluando la exposición de *C. papaya* Maradol a un estrés térmico. Esto sugiere que la baja en la tasa de crecimiento relativo es una respuesta de la planta para utilizar sus reservas en otros procesos que le permitan tolerar el estrés. En este sentido, se observó que la plantas Silvestre expuestas al estrés por déficit hídrico presentaban mayor longitud en la raíz (18 cm) en comparación con Maradol (10 cm) también expuesta a 21 días de no riego, esto es considerado como un mecanismo de tolerancia al estrés hídrico en *C. papaya* específicamente para el tipo

Silvestre que busca agua disponible en el suelo al aumentar el área total de la raíz principal (Ivonne y Mirando, 2007).

Las modificaciones anatómicas, morfológicas y fenológicas de las plantas expuestas a periodos prolongados de déficit hídrico se deben básicamente a las alteraciones en los patrones estacionales y ritmos de división y elongación celular. Una de las principales manifestaciones visibles es el marchitamiento característico de las hojas (Granados-Sánchez *et al.*, 1998). De hecho un buen indicador de tolerancia a un estrés por déficit hídrico es la senescencia foliar tardía, que puede evaluarse en etapa juvenil, junto con otras variables (Agbicodo *et al.*, 2009). La senescencia foliar tardía es considerada como un mecanismo adaptativo que reduce la tasa de transpiración y le permite la recuperación post-estrés (Hall, 2004; Soloarte, 1992).

En esta tesis, se registró la senescencia foliar de dos genotipos de *C. papaya* a los diferentes tiempos evaluados. Se observó que el genotipo Silvestre retiene un mayor número de hojas por más tiempo aún en condiciones de estrés, contrario a Maradol que redujo hasta un 30% el número de hojas a los 7 días de iniciado el tratamiento. Al día máximo de estrés la reducción en el número de hojas fue significativamente mayor en Maradol con un 90% en comparación con Silvestre que tuvo una reducción en su número de hojas en tan sólo 70%. Aunado a ello, se observó que durante la recuperación, el genotipo Silvestre mantuvo el número de hojas completamente expandidas unidas al tallo, signo de mayor tolerancia al estrés, caso contrario a Maradol que incluso después de reincorporado el riego siguió perdiendo hojas, lo que afectó la capacidad de recuperar los valores iniciales de la mayoría de los parámetros evaluados.

Un comportamiento similar ha sido reportado en plantas de *Populus* expuestas a un estrés por déficit hídrico, en donde se observó un aumento en la tasa de abscisión en respuesta al estrés (Pallardi, 1991). Caso contrario a lo que ocurre en los cítricos, en donde las hojas se dañan por el déficit hídrico, pero contrario a lo que sucede en papaya, se quedan adheridas al tallo hasta que el riego es reincorporado nuevamente y ocurre la abscisión. Comportamientos similares han sido observados en plantas de algodón; se ha sugerido que durante el estrés por déficit hídrico, un factor inductor de abscisión es sintetizado en las raíces de los cítricos, y transportado a las partes aéreas donde genera la abscisión (Tudela, 1992).

III.6.1.1. Potencial Hídrico (Ψ_H)

El potencial hídrico se basa en el potencial químico del agua que es una expresión cuantitativa de la energía libre asociada con el agua, en otras palabras, el trabajo que se debe realizar para llevar una unidad de masa de agua, ligada al agua misma o al suelo hasta un estado de referencia cero (Taiz y Zeiger, 2006). Se han reportado valores aproximados de potenciales hídricos foliares letales en las plantas entre -1,4 a -6,0 MPa. En el frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) se han registrado entre -1,5 y -2,5 MPa, lo que ha permitido clasificarla como una especie moderadamente tolerante al déficit de agua en el suelo (Boyer, 1978); para papaya se han reportado valores de -0.7 a -0.8 MPa en *Carica papaya* cv. Baixinho de Santa Amalia (Mahouachi *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en el potencial hídrico son bastante interesantes, ya que aumenta en ambos genotipos en respuesta al estrés, siendo más negativo en Maradol, además, se observa una recuperación en los valores de Ψ_H una vez que el riego es reincorporado. Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Mahaouchi *et al.*, (2006), quienes observaron poca variación en el potencial hídrico en hojas sometidas a un periodo largo de estrés por déficit hídrico. Los resultados publicados por Mahouchi son apoyados por Marler *et al.*, (1998) quienes mostraron que el potencial hídrico en hoja y el potencial del xilema no se veían afectados por el estrés en plantas jóvenes de papaya. De acuerdo a la literatura, *Carica papaya* es una especie que responde al déficit hídrico aplazando la deshidratación, las plantas de papaya sometidas a estrés por falta de agua muestran una tendencia a acumular iones como K^+ , Na^+ y Cl^- . El aumento en el número de iones que se registran conforme aumentan los días de exposición al estrés parece contribuir al ajuste osmótico y a mejorar la tolerancia a estrés por déficit hídrico de estas plantas.

De acuerdo a lo reportado por Mahouachi *et al.*, 2006, los valores fotosintéticos descienden así como la tasa de crecimiento; sin embargo una vez que el riego es reincorporado se estimula el crecimiento nuevamente, el brote de hojas nuevas y se reestablece la tasa fotosintética. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo y nos indican que la habilidad de las plantas de papaya para incrementar su tolerancia al estrés no está determinada exclusivamente por la reducción en la abscisión de hojas, disminución en la tasa de crecimiento o en la asimilación de CO_2 , sino por el

contrario sugieren que bajo las condiciones de déficit hídrico poseen cierta capacidad de incrementar su contenido de iones (Na, K y Cl), lo que contribuye al ajuste osmótico que fue más evidente en Maradol en donde se observó un ajuste de su potencial a diferencia del genotipo Silvestre en donde no hubo tanta variación. (Stokes y Stokes, 2000; Marler y Mickelbart, 1998; Marler *et al.*, 1994). Sin embargo, para corroborar esta idea, es necesario medir el potencial osmótico en plantas de ambos genotipos expuestas a condiciones de estrés similar.

III.6.1.2. Fotosíntesis (Pn)

Se ha documentado ampliamente que un estrés por déficit hídrico limita la tasa de fotosíntesis a través del cierre estomático y por un deterioro en el metabolismo (Lawlor y Cornic, 2002; Flexas y Medrano, 2002; Cornic, 2000; Chaves, 1991; Boyer, 1976). Cuando las plantas pasan por un periodo de déficit hídrico, la tasa de fotosíntesis puede o no retornar a los niveles anteriores, dependiendo del material genético, severidad y duración del estrés y la humedad relativa; de esta manera, las plantas que consiguen recuperarse y vuelven a fotosintetizar como antes del estrés, poseen una mayor tolerancia al déficit hídrico (Kozlowski y Pallardy, 1997). Se ha encontrado que los efectos perjudiciales del estrés por déficit hídrico en el aparato fotosintético puede durar días, semanas o hasta meses; por lo que la capacidad de las plantas estresadas de recuperar su capacidad fotosintética puede estar asociada a la capacidad de los estomas de reabrirse parcial o totalmente y a la síntesis de proteínas para reparar el daño sufrido por el aparato fotosintético (Pompelli *et al.*, 2010; Kozlowski y Pallardy, 1997). Cruz de Carvalho *et al.*, (1998) demostraron que la conductancia estomática (g_s) y la tasa neta de asimilación (A , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de CO_2) durante y después del tratamiento de estrés por déficit hídrico son parámetros confiables para identificar tolerancia a este estrés en *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata*. Estudios previos realizados por Mahouachi (2001) reportaron rangos fotosintéticos para *Carica papaya* de 8 a 10 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para una planta control en condiciones de riego constante y para una planta expuesta a 30 días sin riego los valores alcanzados fueron de 2.0-2.2 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mismos que lograron recuperarse una vez reestablecido el riego.

Nuestros resultados señalan que las plantas Silvestre tienen una afectación menor en la tasa de fotosíntesis a partir del día 7 de iniciado el tratamiento por déficit hídrico, caso

contrario a lo observado en las plantas Maradol en donde los valores de fotosíntesis disminuyeron en los primeros días de suspendido el riego. Es decir, las plantas Silvestre pueden tolerar un periodo de 7 días de estrés por déficit hídrico, sin que éste afecte su tasa fotosintética, mientras que para las plantas Maradol los valores de fotosíntesis se reducen en un 85%. A pesar de que ambos genotipos registraron los valores más bajos de fotosíntesis al día 21, una vez de reincorporado el riego las plantas Silvestre alcanzaron valores equiparables con la planta control, caso contrario a Maradol que registró una tasa fotosintética significativamente menor a la de Silvestre. La capacidad de recuperación tanto de Maradol como de Silvestre nos indican que ambas son tolerantes al estrés por déficit hídrico impuesto, sin embargo la rápida respuesta del genotipo Silvestre a una rehidratación lo señala como el más tolerante.

III.6.1.3. Fluorescencia de clorofila *a* (F_v/F_m)

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (PS II) del aparato fotosintético de plantas terrestres, acuáticas y algas hace posible caracterizar los efectos y modos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental. Varios autores concuerdan en que F_v/F_m es un parámetro fisiológico muy sensible que puede ser utilizado como medida cuantitativa muy eficaz para caracterizar el grado de estrés al que está expuesta una planta, ya que además de ser sensible, no es destructivo, es *in situ*, *in vivo* y rápido; por lo que su medición es una manera de conocer internamente el estado fisiológico del PS II, componente principal del aparato fotosintético (González *et al.*, 2000; Smille y Nott, 1982).

En la literatura se ha reportado que el valor de F_v/F_m en un gran número de especies se mantiene cercano a 0.800, indicativo de que el FS II se encuentra íntegro y con un uso altamente eficiente de la energía de excitación en el proceso fotoquímico, por lo que puede ser utilizado como un criterio del nivel de estrés (Willits y Peet, 2001; Maxwell y Johnson, 2000). Así, un aumento en la exposición a diferentes tipos de estrés como el térmico, hídrico o lumínico, provocan una disminución en la proporción F_v/F_m , que responde a la disminución de F_v ($F_v = F_m - F_o$) mientras F_o aumenta, F_m se mantiene sin mucha variación (Yamada, 1996), bajo estas condiciones de estrés las plantas presentan una incapacidad para utilizar de manera eficiente la luz, de esta forma cuando la afectación es reversible se nota un incremento de la respuesta fotoinhibitoria, es decir hay

una disminución de los valores F_v/F_m , el valor vuelve a incrementarse una vez que ha pasado el evento estresante.

En esta tesis el valor de F_v/F_m en plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* Maradol y Silvestre expuestas a diferentes periodos sin riego (0, 7, 14 y 21 d) disminuyó conforme aumentaron los tiempos de exposición (0.80 Maradol y 0.78 Silvestre) y aumentaron de nueva cuenta durante el periodo de recuperación de 1 d y 7 días (0.81 Maradol y 0.79 Silvestre). Sin embargo los valores obtenidos no son significativamente diferentes en relación a los grupos control (0.84 Maradol y 0.83 Silvestre), por lo que es difícil interpretar la disminución de los valores de F_v/F_m como un indicador del grado de afectación a la planta.

Esto coincide con lo reportado por Marler y Mickelbart (1998), quienes analizaron el intercambio gaseosos y fluorescencia de clorofila *a* en plantas de papaya "Red Lady" bajo condiciones de estrés por déficit hídrico, ellos reportan que el estrés no influyó en los valores de F_v/F_m durante todo el experimento con valores que oscilaron en (0.74) en comparación con el control (0.80). Por otra parte, en la exposición a un estrés térmico en plantas de *C. papaya* Maradol se ha visto que la exposición al estrés sólo provoca una ligera disminución en el valor de F_v/F_m (Alcocer, 2013; Nakasone y Paull, 1998) lo que sugiere que el estrés por déficit hídrico y térmico, sensibilizan al aparato fotosintético por el aumento en la incidencia de luz y provoca una inhibición de la fotosíntesis lo que puede preceder a cualquier cambio apreciable en la fluorescencia de clorofila *a* (Björkman y Powles, 1984; Ludlow y Björkman, 1984).

III.6.1.4. Fuga de electrolitos (%)

Bajo condiciones de estrés, la membrana de las plantas están bajo la influencia de cambios asociados con el incremento en la permeabilidad y la pérdida de su integridad (Blokhina *et al.*, 2003). Por lo tanto, el incremento en el porcentaje de fuga de electrolitos indica daños en la membrana bajo un estrés ya sea térmico, por salinidad o por déficit hídrico. También se ha propuesto que la integridad en membranas superiores de plantas tolerantes, resulta en una controlada fuga de electrolitos cuando son sometidos a una condición de estrés (Chaves y Oliveira, 2004).

Los resultados obtenidos en ésta tesis, indican que *Carica papaya* Maradol tiene un porcentaje mayor de fuga de electrolitos (50%) en comparación con Silvestre (35%) al día 21 de estrés por déficit hídrico. El aumento en el porcentaje de fuga de electrolitos en el tejido foliar del genotipo Maradol, refleja el grado de deterioro de la membrana plasmática que presentan las células de las hojas, cuando la planta crece bajo estas condiciones de estrés. Este comportamiento coincide con lo reportado por Bajji, *et al.*, (2001) donde evaluaron la fuga de electrolitos en Trigo (*Triticum durum*) bajo un estrés por déficit hídrico, obteniendo un aumento en el % de fuga de iones conforme aumentaba el tiempo de exposición al estrés. Estudios similares se han llevado previamente en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, evaluando el efecto de un estrés térmico en *C. papaya* Maradol, observando que la fuga de electrolitos aumenta con la exposición al estrés y disminuye en los periodos de recuperación.

El grado del daño a la membrana celular inducido por cualquier estrés puede ser medido por la fuga de electrolitos de las células. Los genotipos tolerantes tienden a tener un porcentaje de fuga de electrolitos menor comparado con los genotipos susceptibles al déficit hídrico (Boldaji *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Roy *et al.*, (2009), demostró que la acumulación de polipéptidos y el porcentaje en la fuga de electrolitos pueden ser utilizados como indicadores para seleccionar una planta tolerante a un déficit hídrico entre tres cultivares de *Solanum lycopersicum*. Los resultados obtenidos de este estudio indicaron que para los tres cultivares evaluados (Pusa Ruby, Arka Vikas y Pusa Early Dwarf) el déficit hídrico aumentaba la fuga de electrolitos, sin embargo el rango era menor en uno de ellos, concluyendo que el cultivar Pusa Ruby fue el cultivar más tolerante al estrés hídrico.

Los datos obtenidos indican que para ambos genotipos, el % de fuga de iones incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición al estrés por déficit hídrico, lo que indica una correlación positiva entre el nivel de estrés por déficit hídrico y el daño en membrana. De igual forma, se observó que el daño en membrana medido fue significativamente mayor para Maradol en todos los tiempos. Esto indica que la membrana de las plantas Maradol es más susceptible a un estrés por déficit hídrico en comparación a Silvestre, donde se observó que una vez reincorporado el riego se disminuyó el daño en membrana. De acuerdo a lo reportado en la literatura y en base a nuestros resultados, se puede concluir

que el genotipo Silvestre al presentar un porcentaje de fuga de electrolitos menor puede considerarse como tolerante.

III.6.2. Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de *Carica papaya* Maradol y Silvestre

Los resultados obtenidos en la caracterización fisiológica ante un estrés hídrico concuerdan con estudios previos realizados por Mahouachi *et al.*, (2006), quienes evaluaron la capacidad de recuperación de plántulas de *Carica papaya* cv. "Baixinho de Santa Amalia", expuestas a un déficit hídrico por 34 días y su recuperación. Ellos reportaron que la principal respuesta al estrés fue la reducción en el rango fotosintético, siendo más evidente al día 34 donde se redujo hasta un 76% lo que se correlaciona con la disminución en la humedad del suelo. Por otra parte, una vez iniciado el periodo de rehidratación las plantas recuperaron su tasa fotosintética, estimularon el crecimiento y el brote de nuevas hojas. Nuestros resultados, contradicen lo reportado para cítricos sometidos a periodos de estrés por déficit hídrico y recuperación; en donde se ha visto que una vez aplicado el riego no se alcanzan los rangos fotosintéticos, incluso después de aplicar un riego constante, lo que indica que el estrés por déficit hídrico dañó los tejidos de las hojas. Por el contrario, en nuestro estudio, se observó que ambos genotipos logran recuperarse al estrés impuesto, por lo que el daño ocasionado por el estrés no afectó de manera crítica al tejido (Tudela y Primo-Milo, 1992).

III.6.2.1. Intercambio de gases

La limitación del crecimiento de la planta debido a una baja disponibilidad de agua se debe en principio a la reducción en el balance de carbono en la planta, que afecta en gran medida a la fotosíntesis (Flexas *et al.*, 2009). Sin embargo, existe un debate sobre si el factor restrictivo para la fotosíntesis durante el estrés por déficit hídrico es el cierre estomático o es debido a un metabolismo incompleto (Pinheiro y Chaves, 2011; Flexas *et al.*, 2009; Flexas y Medrano, 2002; Lawlor y Cornic, 2002). Una disminución en la difusión del CO₂ atmosférico al sitio de carboxilación en las hojas es considerado como la principal causa en la disminución de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés hídrico (Chaves *et al.*, 2009; Grassi y Magnani, 2005; Flexas *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando un descenso en la conductancia estomática es combinada con una fuerte radiación, las hojas están

expuestas a un exceso en la incidencia de energía y baja disponibilidad del CO₂ intercelular debido a la reducción del rango de producción que excede su rango de consumo durante el ciclo de Calvin (Pinheiro y Chaves, 2011). Bajo estas condiciones, una regulación baja e incluso la foto inhibición de la fotosíntesis puede convertirse en un potente mecanismo de defensa en las plantas C₃ (Demmig-Adams *et al.*, 2006).

A partir del análisis de los diferentes parámetros implicados en el intercambio de gases, se observa que el genotipo Silvestre tiene una mayor tasa de transpiración lo que puede relacionarse con el número de estomas presentes en la parte abaxial de la hoja. Sin embargo, el hecho de una tolerancia mayor al estrés a pesar de la alta densidad estomática, sugiere que la tolerancia al estrés por déficit hídrico está dada más por una vía no estomática. Para poder sustentar lo antes descrito, es necesario evaluar la transpiración cuticular, de esta forma podría explicarse que la tolerancia se deba a una vía no estomática.

III.6.2.2. Densidad Estomática

Al evaluar la anatomía foliar de plantas transgénicas y no transgénicas de *Carica papaya* L. Leal-Costa *et. al.*, (2010) señalaron que las hojas de *C. papaya* son hipoestomáticas y dorsiventrales, lo que coincide con nuestras observaciones realizadas en hojas de dos genotipos de *C. papaya* Maradol y Silvestre. El número de estomas por unidad de área observada (0.02 cm²) fue mayor para las plantas Silvestre (81) en comparación con Maradol (67), esta diferencia en el número de estomas en el tiempo 0 puede relacionarse con la tasa de intercambio gaseoso que es mayor en el genotipo Silvestre. El intercambio de gases entre la hoja y la atmósfera se lleva a cabo a través de la apertura estomática, que es regulada por señales endógenas (hormonas vegetales como el ácido Abscísico) y por varias condiciones ambientales entre las que se incluyen: la luz, temperatura, humedad del aire, humedad del suelo, concentración atmosférica de CO₂, transporte de iones a través de la membrana, así como por otros factores que modulan la apertura estomática para la regulación del intercambio de gases y supervivencia de las plantas en diferentes condiciones (Shimazaki *et al.*, 2007; Schroeder *et al.*, 2001; Assmann y Shimazaki, 1999).

Por otra parte, la DE en los diferentes tiempos de exposición evaluados no presentaron variaciones en ninguno de los genotipos, caso contrario a lo observado por Pares *et al.*, (2008), quienes evaluaron el efecto de los niveles de salinidad sobre la DE en plantas de *C. papaya* Maradol, los resultados obtenidos demostraron que la salinidad del agua de riego promovió variaciones en la DE. El hecho de que ante un estrés por déficit hídrico el número de estomas se mantenga sin cambio durante todo el experimento sugiere que la tolerancia al estrés se da por vías no estomáticas, como la acumulación de ceras en la superficie de las hojas para reducir la pérdida de agua por transpiración

III.7. CONCLUSIONES

- En esta tesis, se observó que el genotipo Silvestre retiene un mayor número de hojas por más tiempo, aún en condiciones de estrés, contrario a Maradol que redujo hasta un 30% el número de hojas a los 7 días de iniciado el tratamiento. Al día máximo de estrés la reducción en el número de hojas fue significativamente mayor en el genotipo Maradol con un 90% en comparación al 70% de Silvestre. Además, se observó que durante la recuperación, el genotipo Silvestre mantuvo el número de hojas, signo de mayor tolerancia al estrés, caso contrario a Maradol que incluso después de reincorporado el riego siguió perdiendo hojas. Los datos obtenidos de la tasa de abscisión de hojas al ser extrapolados a condiciones de campo pueden significar una reducción en el rendimiento por parte las plantas Maradol.
- Ante un estrés por déficit hídrico, la tasa de crecimiento disminuye como respuesta a la afectación de la elongación celular, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la tasa de crecimiento de los dos genotipos evaluados, son afectados por el estrés impuesto. Por otra parte, el retardo en la abscisión foliar en el genotipo Silvestre y el aumento en la longitud de la raíz como estrategia para tolerar el estrés, sugieren que las respuestas morfológicas observadas en las plantas Silvestre le confieren mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico.
- Los datos obtenidos del parámetro de Ψ_H , sugieren que las plantas de *Carica papaya* de ambos genotipos, son capaces de detectar la poca disponibilidad de agua en el suelo durante los primeros días de iniciado el tratamiento por déficit hídrico y además, son capaces de identificar los cambios en el Ψ_H del suelo una vez que el riego es reincorporado, lo que se ve reflejado en un aumento en los valores del Ψ_H en el tejido de hoja y que podría permitir activar los diferentes mecanismos de adaptación.
- La literatura señala que los principales parámetros fisiológicos afectados son la fotosíntesis y que junto a la conductancia estomática, CO_2 intercelular y la transpiración nos dan un panorama del daño que sufre la planta a nivel fotosintético. Nuestros resultados indican una disminución en la tasa de fotosíntesis que es mayor para el genotipo Maradol a diferencia del Silvestre, sin embargo una vez reincorporado el riego ambos genotipos aumentan sus niveles

de fotosíntesis. La capacidad de recuperación observada en ambos casos indica que ambas son tolerantes al estrés por déficit hídrico impuesto. No obstante, la capacidad de respuesta del genotipo Silvestre a una rehidratación lo señala como el más tolerante

- Los valores de F_v/F_m evaluados ante un estrés por déficit hídrico en las plantas de *C. papaya* no presentaron cambios significativos en los diferentes tiempos de exposición. Concluyendo que este parámetro no puede ser utilizado como indicador de la afectación del estrés a la planta y que además la disminución que vemos en la tasa de fotosíntesis de *C. papaya* se debe más a la reducción en el área foliar y no a un daño en el PSII, lo que se ve reflejado en los valores de la F_v/F_m .
- De acuerdo a los resultados obtenidos en la medición de la fuga de electrolitos, se observa que el genotipo Silvestre tiene una fuga de electrolitos 20% menor a Maradol, que se traduce en un daño menor a la membrana, aunado a ello la capacidad de reparación de la membrana en el genotipo Silvestre la señalan como el más tolerante al estrés por déficit hídrico.
- Interesantemente, las hojas de *Carica papaya* son de tipo hipoestomáticas, es decir poseen la mayoría de sus estomas en la parte abaxial, esto quizás, como una adaptación al medio ambiente. Es importante puntualizar que en base a los parámetros de g_s evaluados se observó que papaya tiene una capacidad de controlar la apertura y cierre de estomas; sin embargo esta regulación estomática parece ser más eficiente en el genotipo Silvestre, ya que se observó que la planta es capaz de responder al estímulo al primer día de aplicado el riego.
- Se observó que la tasa de transpiración en el genotipo Silvestre fue mayor ($3.5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con respecto a Maradol ($3 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en el punto máximo de estrés, lo que puede relacionarse con el número de estomas en el genotipo Silvestre (87) que también fue mayor en comparación a Maradol (61), estos datos sugieren que la tolerancia al déficit hídrico por parte de las plantas Silvestre está dada por una vía no estomática, y que la inducción de la biosíntesis de la cutícula puede ser parte de los mecanismos de la tolerancia adquirida a estrés hídrico por parte del genotipo Silvestre.

III.8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Díaz, E., I. Hernández-Torres, R. Rodríguez-Guerra, J. Acosta-Gallegos, J. Pedroza-Flores, M. Amador-Ramírez y J. Padilla-Ramírez (2009). Efecto de la sequía en la producción de biomasa y grano de frijol. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, **2**(2):249-263.
- Agbicodo, E.M., C.A. Fatokun, S. Muranaka, R.G.F. Visser y C.G. Linden van der (2009). Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishment, and future prospects, *Euphytica*, **167**: 353-370.
- Alcocer, C. (2013). Caracterización del efecto por incremento de temperatura y tiempo de exposición sobre la fisiología y expresión de genes HSF en *Carica papaya* L. cv. Maradol. Tesis de Maestría. CICY, México. pp. 70-80.
- Ang, L.H. y L.T. Ng (2000). Trace Element Concentration in Mango (*Mangifera indica* L.), Seedless Guava (*Psidium guajava* L.) and Papaya (*Carica papaya* L.) Grown on Agricultural and Ex-mining Lands of Bidor, Perak, Pertanika J. Trop. Agric. Sci. **23**(1): 15-22.
- Assmann, S.M. y K. Shimazaki (1999). The multisensory guard cell: stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol.*, **119**, 809–815.
- Bajji, M., K. J-M. Kinet y L. Stanley (2001). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Grow. Reg.*, **8**:1-10.
- Begg, J.E. (1980). Morphological adaptations of leaves to water stress. En: N.C. Turner and P.J. Kramer (eds.). *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Wiley Interscience, New York. p.33–42.
- Betts, R.A., P.M. Cox, S.E. Lee y F.I. Woodward (1997). Contrasting physiological and structural vegetation feedbacks in climate change simulations. *Nature*, **387**:796–799, 1997.
- Björkman, O. y S.B. Powles (1984). Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: Interaction with light level. *Planta*, **161**: 490-504.

- Blokhina, O., E. Virolainen y K.V. Fagerstedt (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann. Bot.*, **91**:179–194.
- Blunden, J., y D. S. Arndt, Eds., (2012): State of the Climate in 2011. *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, **93** (7), S1-S264.
- Boldaji, S.A., R.A. Khavari-Nejad, R. Hassan, H. Fahimi y S. Saadatman (2012) Water availability effects on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Acta Physiol Plant*, **34**: 1177-1186.
- Boyer, J.S. (1970). Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiol.*, **46**:233-235.
- Boyer, J.S. (1976). Photosynthesis at low water potentials. *Physiol. Trans. Roy. Soc.*, **273**:501-512.
- Campostrini, E. y D.M. Glenn (2007). Ecophysiology of papaya: a review. *Brazilian J. Plant Physiol.*, **19**:413-424.
- Campostrini, E., D.M. Glenn y O.K. Yamanishi (2010). Papaya: Ecophysiology of growth and production. En: DaMatta (ed). *Ecophysiology of tropical tree crops*. Nova Science Publishers: Inc., Hauppauge, NY. pp. 285-307.
- Carr, M.K.V. (2013). The water relations and irrigation requirements of papaya (*Carica papaya* L.): a review. *Exp. Agricul.* **1-14**.
- Chaves, M.M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, **42**:1-16.
- Chaves, M.M., J. Flexas y C. Pinheiro (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* **103**:551–560.
- Chaves, M.M., J.P. Maroco, y J.S. Pereira (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Func Plant Biol* **30**:239–264
- Clarke, S.M., L.A.J. Mur, J.E. Wood y I.M. Scott (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermo tolerance but is not essential for acquired thermo tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **38**: 432-447.

- Clemente, H.S. y T.E. Marler (1996). Drought stress influences gas-exchange responses of papaya leaves to rapid changes in irradiance. *J. Ame. Soc. Hort. Sci.* **12**:292-295.
- Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trend Plant Sci.* **5**: 187-188.
- Cruz de Carvalho, M.H., D. Laffray y P. Louguet (1998). Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. *Environ. Exp. Bot.* **40**:197-207.
- Demmig-Adams, B., W.W. Adams, y A.K. Matoo, eds. (2006). Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment. Dordrecht: Springer.
- Flexas, J. y Medrano, H. (2002). Energy dissipation in C₃ plants under drought. *Funct. Plant Biol.* **29**:1209-1215.
- Flexas, J., J. Bota, F. Loreto, G. Cornic y T.D. Sharkey (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C plants. *Plant Biol.* **6**: 269-279.
- Flexas, J., M. Barón, J. Bota, J-M. Ducruet, A. Gallé, J. Galmés, M. Jiménez, A. Pou, M. Ribas-Carbó, C. Sajnani, M. Tomàs y H. Medrano (2009). Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110. *J. Exp. Bot.* **60**:2361-2377.
- Goddard Institute for Space Studies, (GCISS) (2010). Second Warmest Year on Record; End of Warmest Decade [on line] (actualizado 21 febrero de 2010). Disponible en: <http://www.giss.nasa.gov/research/news/20100121/> [Acceso 10 enero de 2013].
- Gomes, M. A. Torres, E. Campostrini, R. Bressan-Smith, M.A. Teixeira, T. Massi, L. Siqueira, N. Rocha y M. Núñez-Vázquez (2013). Brassinosteroid analogue affects the senescence in two papaya genotypes submitted to drought stress. *Theor. Exp. Plant Physiol.*, **25**(3): 186-195.
- González, S., H. Perales y M.O. Salcedo (2000). La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas, *REB*, **27**(4): 119-129.

- Granados-Sánchez, D., R.G.F. López, y J.L. Gama-Flores (1998). Adaptaciones y estrategias de las plantas de zonas áridas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 4(1): 169-178.
- Grassi, G. y F. Magnani (2005). Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ.* 28:834–849.
- Hall, A. (2004). Breeding for adaptation to drought and heat in cowpea. *Europ. J. Agron.* 21: 447-454.
- Hewezi, T. M. Leger y L. Gentzbittel (2008). A comprehensive analysis of the combined effects of high light and high temperature stresses on gene expression in sunflower. *Ann. Bot.*, 102:127-140.
- Hoffman, A. y H. Poorter (2002). Avoiding Bias ins Calculations of Relative Growth Rate. *Ann. Bot.*, 80: 37-42
- Hsiao, T.C., E. Acevedo, E. Fereres, y D.W. Henderson. (1976). Stress metabolism: Water stress, growth and osmotic adjustment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 273:479-500.
- Ingram, .J. y D. Bartels (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:377–403.
- Ivonne, A. y D. Mirando (2007). Efecto de cinco sustratos sobre índices de crecimiento de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) bajo invernadero, *Rev. Col. Cnc. Hort.*, 1: 22-27.
- Kirkham M.B. (2011). Elevated Carbon Dioxide: Impacts on Soil and Plant Water Relations. CRC Press. pp.415.
- Kozlowski, T.T. y S.G. Pallardy . 1997. Physiology of woody plants. 2 da. ed. Academic Press. Academic Press. San Diego, CA. pp. 147-153.
- Lawlor, D.W. y G. Cornic (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25: 275–294.

- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol 2. Water, Radiation, Salt and other Stresses. Academic Press, New York, pp 93–128.
- Lu, S. Z. Guo y X. Peng (2003). Effects of ABA and S-3307 on drought resistance and antioxidative enzyme activity of turfgrass. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **78**: 663-666.
- Ludlow, M.M. y O. Björkman(1984). Paraheliotropic leaf movement in Sirato as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: Damage by excessive light and heat. *Planta*, **161**: 505-518.
- Mahaouachi, J., V. Arbona y A. Gómez-Cadenas (2007). Hormonal changes in papaya seedlings subjected to pregressive wáter stress and re-watering. *Plant Growth Regul.*, **53**:43-51.
- Mahouachi, J., A.R. Socorro y M.N. Talo (2006) Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and rehydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant Soil*, **281**:137–146
- Mahouachi, J., R. Argamasilla y A. Gómez-Cadenas (2012). Influence of exogenous glycine betaine and abscisic acid on papaya in responses to water-deficit stress. *J. Plant Growth Regul.*, **31**: 1-10.
- Malo, S.E. y C.W. Campbell (1986). The Papaya. Gainesville: University of Florida, Cooperative Extension Service Fruits Crops Fact Sheet FC.
- Marler, T.E. y M.V. Mickelbart (1998). Drought, Leaf Exchange, and Chlorophyll Fluorescence of Field-grown Papaya. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **123**(4): 714-718.
- Marler, T.E., A.P. George, R.J. Nissen y P.C. Andersen (1994). Miscellaneous tropical fruits. In: Schaffer B, Andersen PC (eds). Sub-tropical and tropical crops. Handbook of environmental physiology of fruit crops, Vol.2. Boca Raton: CRC Press. pp.199-224.
- Maxwell, K. y G.N. Johnson (2000). Chlorophyll fluorescence, a particular guide. *J. Exp. Bot.*, **51**(345): 1214-1218.
- Mohamed, G.D., W.D. Binder y L. Gilles (1995). Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. For. Res.*, **10**: 383-410.

- Munns, R. y G.R. Gramer (1996). Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid. *Plant Soil*, **185**: 33-49.
- Muñozcano, M., y C.O. Martínez (2008). Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa, A.C. pp.1-13.
- Nakasone, H.Y. y R.E. Paull (1998). Papaya, En: *Tropical fruits. Crop production science in horticulture N°7*. CAB International Publication (ed), Wallingford UK, pp. 239-269.
- Nonami, H., Y. Wu y J.S. Boyer (1997). Decreased growth induced water potential: a primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Plant Physiol.*, **114**:501-509.
- Ogen, E., y G. Öquist (1985). Effects on drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta*, **166**:380-388.
- Okon, I.E. (2013). Effect of water stress on some growth aspect of two varieties of cowpea, *Vigna unguiculata* L. Walp. Fabaceae. *Bullet. Environ. Pharmacol. Life Sci.* **2**(5):69-74.
- Ortiz, M. (2006). Respuestas fisiológicas y bioquímicas de dos especies de pinos en condiciones limitantes de humedad. Tesis de Licenciatura. Universidad del estado de Hidalgo, México. pp.7.
- Ortiz-Hernández, Y. D., M. Livera-Muñoz, M. T. Colinas-Leon, y A. Carrillo-Salazar. (1999). Estrés hídrico e intercambio de CO₂ de la pitahaya. *Agrociencia* **33**:397-405.
- Parés, J., M. Arizaleta, M.E. Sanabria y G. García (2008).Efecto de los niveles de salinidad sobre la Densidad Estomática, Índice Estomático y el Grosor foliar en plantas de *Carica papaya* / *ACTA BOT. VENEZ*, **31**(1):27-34.
- Leal-Costa, M.V., M. Munhoz, P.E. Meissner, F. Reinert y E. Schwartz (2010). Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Carica papaya* L. (Caricaceae) *Acta bot. bras.* **24**(2): 595-597.
- Perveen, A., R. Abid y R. Fatima (2007). Stomatal types of some dicots within flora of Karachi, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, **39**(4):1017-1023.

- Petit-Jiménez, D., A. González-León, G. González-Aguilar, R. Sotelo-Mundo y R. Báez-Sañudo (2007). Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica* L., Rev. Fito. Mex., **30**(1): 51-60.
- Pinheiro, C. y M.M. Chaves (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? J. Exp. Bot. **62**:869–882.
- Pompelli, M., R. Barata, H. Vitorino, E. Gonçalves, E. Rolim, M. Santos, J. Almeida, V. Ferreira, E. Lemos y L. Endres (2010). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. Biom. Bioenergy, **34**(8):1207-1215.
- Prasad, R.D., S.H. Rangeshwaran, S.V. Hegde y C.P. Anuroop (2002). Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field condition. Crop Protection. **21**:293-297.
- Price, A.H., J.E. Cairns, P. Horton, H.G. Jones y H. Griffiths (2002). Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. J Exp. Bot., **53**:989–1004.
- Pungulani, L.L.M., J.P. Millner, W.M. Williams y M. Banda (2013). Improvement of leaf wilting scoring in cowpea (*Vigna Sinensis* (L.) Walp.): From qualitative scale to quantitative index. Aust. J. Crop Sci. **7**(9):1262-1269.
- Qasem, J.R. y K.N. Biftu. (2010). Growth analysis and responses of cowpea (*Vigna Sinensis* (L.) Savi ExHassk. and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.), grown in pure and mixed stands, to density and water stresses. The Open Hortic. J. **2**(3):21-30.
- Rivero, R.M., M. Kojima, A. Gepstein, H. Sakakibara, R. Mittler, S. Gepstein y E. Blumwald (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **104**(49):19631-19636.
- Roy, R., V. Agrawal y S.C. Gupta (2009). Comparison of drought-induced polypeptides and ion leakage in three tomato cultivars, Biologia Plantarum, **53**(4):685-690.

- Schroeder, J.I., G.J. Allen, V. Hugouvieux, J.M. Kwak y D. Waner (2001). Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 627–658.
- Shao, H.B., L. Jaleel y C. Zhao (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 215-25.
- Shimazaki, K., M. Doi, S.M. Assmann y T. Kinoshita (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**: 219–247.
- Smille, R.M. y R. Nott (1982). Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiol*, **70**:1049-1054.
- Solarte, C. M. (1992). Efectos de estrés hídrico en la fisiología y actividades fotoquímicas del frijol. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp.3.
- Stokes, A. y A. Stokes (2000). Water conductance and osmotic potential of papaya (*Carica papaya* L.) roots as influenced by drought. *The-supporting-roots-of-trees-and-woody-plants: form, function and physiology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 239–244
- Taiz, L. y E. Zeiger (2006). *Plant Physiol.*, Sinauer Associates, Inc. Four Edition. pp.670-705.
- Tudela, D. y E. Primo-Millo (1992). 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Transported from Roots to Shoots Promotes Leaf Abscission in Cleoptra Mandarin (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) Seedlings Rehydrated after Water Stress. *Plant Physiol.* **100**:131-137.
- Wang, Y., L. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, R. Quan, S. Zhou y R. Huang (2012). An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes. *Plant. Mol. Biol.*, **78**:275-288.
- Willits, D.H. y M.M. Peet (2001). Measurement of Chlorophyll Fluorescence as a Heat Stress Indicator in Tomato: Laboratory and Greenhouse Comparisons, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **126**(2):188-194.
- Yamada, M., T. Hidaka y H. Fukamachi (1996). Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Hort.* **67**: 39-48.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE CERAS TOTALES PRESENTES EN HOJAS DE *Carica papaya* L. MARADOL Y SILVESTRE EN RESPUESTA A UN ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO.

IV.1. INTRODUCCIÓN

Hace cuatrocientos millones de años el desarrollo de una barrera delgada, translúcida y permeable llamada cutícula, fue trascendental para que las plantas pudieran colonizar ambientes terrestres (Bernard y Joubès, 2013). A excepción de la apertura estomática, la membrana lipídica mejor conocida como cutícula, cubre la superficie de todos los órganos aéreos de la planta que incluyen: hojas, tallos, flores y frutos (Bernard y Joubès, 2013; Serralta *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2006; Jeffree, 2006). Al ser la capa más externa, la cutícula interacciona directamente con el ambiente donde juega un papel elemental en la tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico; en la adaptación de la planta a diferentes hábitats y en el desarrollo de la misma ya que participa en la regulación morfológica de las células epidérmicas (Serralta *et al.*, 2012).

La ultraestructura de la cutícula varía ampliamente entre las especies, tipo de órgano y estado de desarrollo, se compone de dos polímeros altamente hidrofóbicos: cutina y ceras epicuticulares dispuestas en capas (Domínguez *et al.*, 2009; Isaacson *et al.*, 2009; Leide *et al.*, 2007; Petit *et al.*, 2007). Las ceras epicuticulares son productos hidrofóbicos que pueden ser removidos de la superficie de las plantas mediante una breve inmersión en solventes orgánicos de baja polaridad, como Cloroformo (CHCl_3) y Hexano (C_6H_{14}) (Samuels *et al.*, 2008; Jenks *et al.*, 2002). Generalmente, las ceras de las plantas están compuestas por una serie de alcoholes primarios, aldehídos, alcanos, ácidos grasos, ésteres y en ocasiones de componentes cíclicos como triterpenoides y esteroides (Samuels *et al.*, 2008; Jetter *et al.*, 2006). Las cadenas alifáticas de las ceras son derivadas de los ácidos grasos de cadenas largas (VLCFAs) los cuales pueden ser procesados por dos rutas de biosíntesis: (i) vía de alcoholes: alcoholes primarios y alquil ésteres; (ii) vía de alcanos: aldehídos, alcanos, alcoholes secundarios y cetonas (Bernard y Joubès, 2013).

La síntesis de la cutícula empieza en las fases tempranas del desarrollo, con la formación de la procutícula en el estado globular tardío de la embriogénesis en *Arabidopsis thaliana*

y guarda una estrecha relación con el crecimiento de la planta al proveer la deposición constante de ceras y cutina durante la elongación del tallo (Suh *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2002). A la fecha, se sabe que los componentes de la cutícula son sintetizados en las células epidérmicas antes de ser secretados a la pared celular para cubrir las células de los órganos aéreos, sin embargo se tiene poca información sobre los mecanismos involucrados en el transporte a la pared celular (Bernard y Joubès, 2013).

IV.1.1. Estructura de la Cutícula

La capacidad protectora de la cutícula se debe a las propiedades bioquímicas y físicas de sus dos componentes principales: cutina y ceras cuticulares, que estructuralmente se encuentran apiladas en tres capas, consideradas comunes en todas las plantas superiores (Bernard y Joubès, 2013). Cubriendo la pared celular la primera capa consiste en una mezcla cuticular compuesta de cutina, ceras intracelulares y polisacáridos; y está conectada a la segunda capa que es propiamente la cutícula, compuesta de ceras intracuticulares que son una mezcla amorfa de lípidos embebidos en la cutina que se unen a la cutícula cubierta por una tercera capa que corresponde a las ceras epicuticulares (Figura IV.1). Las ceras epicuticulares conforman la capa exterior de la cutícula, dispuestas micro estructuralmente en cristales de ceras que le confieren hidrofobicidad a la superficie de la planta (Dominguez *et al.*, 2011; Jetter *et al.*, 2006; Kunst y Samuels, 2003; Jetter y Schäffer, 2001).

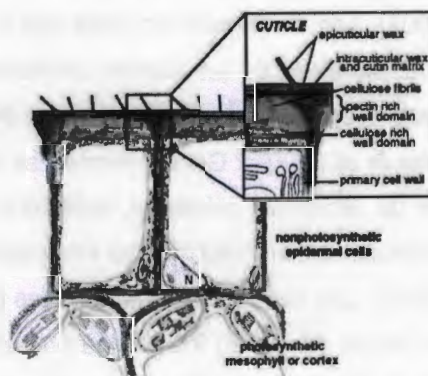


Figura IV.1. Corte transversal de células epidérmicas secretando ceras, se observan los componentes de la cutícula, los dominios de la pared celular y las células epidérmicas no fotosintéticas (Kunst y Samuels, 2003).

IV.1.2. Ceras epicuticulares e intracuticulares

La cutícula está formada por un complejo poliéster con ceras asociadas de naturaleza hidrofóbica y baja reactividad debido a que la mayoría de los grupos carboxílicos presentes en la membrana están esterificados con grupos hidroxilos alifáticos de otros ácidos grasos (Cuadro IV.1) (Domínguez *et al.*, 2011; Riederer y Schreiber, 2001). La separación física de sus componentes usando solventes orgánicos y el análisis por cromatografía de gases ha demostrado que las ceras intracuticulares se encuentran intercaladas dentro del polímero de la cutina y tienen una composición química distinta de las ceras epicuticulares que se encuentran en la superficie exterior de la cutina, formando una capa más o menos uniforme y amorfa (Domínguez *et al.*, 2011; Samuels *et al.*, 2008; Bargel *et al.*, 2006).

Cuadro IV.1. Principales componentes alifáticos en ceras cuticulares (modificado de Kunst y Samuels, 2003).

Tipo de cera	Rango de largo de la cadena en plantas	Largo predominante de la cadena en <i>A. thaliana</i>	Contenido en tallo de <i>A. thaliana</i> (%)
<i>n</i>-Alcanos	C21-C35	C29, C31, C27	38
Alcoholes secundarios	C21-C35	C29, C31, C27	10
Cetonas	C21-C35	C29	30
Alcoholes grasos	C22-C34	C28, C30, C26	12
Ácidos grasos	C16-C34	C30, C28	3
Aldehídos	C21-C35	C30, C28	6
Ésteres cerosos	C32-C64	NA	1

Los principales componentes químicos de las ceras epicuticulares son alcanos, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena larga; y para el caso de las ceras intracuticulares, ácidos grasos de cadena corta (Leide *et al.*, 2011; Cameron *et al.*, 2006; Kunst y Samuels, 2003). Dentro de las ceras epicuticulares también se han encontrado algunos metabolitos secundarios como los triterpenoides, compuestos fenólicos (ácido cumárico y ferúlico, flavonoides, fenilpropanoides), polisacáridos (celulosa y pectina) y algunos polipéptidos (Kunst y Samuels, 2009; Stark y Tian, 2006; Jeffree, 2006; Riederer, 2001). El efecto del agua en las propiedades mecánicas de cada uno de los componentes de la cutícula recientemente está siendo estudiado (López-Casado, 2007). Se ha visto que la presencia dentro de la epidermis de pigmentos que absorben los rayos UV-B, principalmente flavonoides, con una mínima absorción de PAR proporcionan una capa protectora al daño (Sheperd y Griffiths, 2006).

IV.1.3. Propiedades de las ceras cuticulares

A pesar de que la cutícula es un componente minoritario en la masa total de hojas y frutos, las propiedades físicas, químicas, mecánicas y morfológicas que presentan las hace componentes esenciales para la adaptación de la planta a un estrés biótico y abiótico, ya que están involucradas en las siguientes funciones (Figura IV.2):

- A) Preserva el balance de agua, evitando la evaporación o pérdida excesiva de humedad y reduciendo la difusión de gases (Riederer y Schreiber, 2001; Stiles, 1994).
- B) Ofrece una primera línea de defensa contra bacterias y hongos por su propiedades anti adhesivas (Reina-Pinto y Yephremov, 2009; Li *et al.*, 2008; Carver y Gurr, 2006).
- C) Reconoce señales de patógenos e insectos. Pueden actuar como factor químico atrayente o disuasivo. Aunque no está claro si los productos activos pertenecen a las ceras o son metabolitos secundarios de la planta (Tafolla *et al.*, 2013; Chassot *et al.*, 2008; Sandford, 1998).
- D) Termorregulador, al proporcionar un medio de defensa contra el estrés por déficit hídrico, temperaturas altas o daños por la luz ultravioleta (Tafolla *et al.*, 2013).
- E) Brindar soporte mecánico y participar de manera indirecta en la formación correcta de los órganos en las primeras fases de desarrollo (Leide *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2009; Panikashvili, 2007; Riederer, 2006).

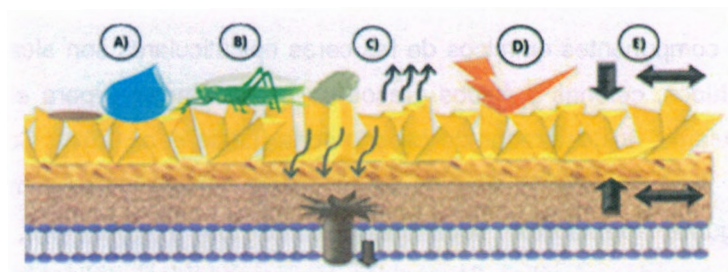


Figura IV.2. Principales funciones de la cutícula en las plantas (Tafolla *et al.*, 2013).

Específicamente ante un estrés por déficit hídrico, se ha sugerido que la acumulación de ceras ocurre de manera indirecta limitando la pérdida de agua por evapotranspiración y también la pérdida de otros gases (CO_2 , O_2) (Panikashvili *et al.*, 2007; Jeffree, 2006; Riederer, 2006). La transpiración está regulada por componentes estomáticos (TR_{st}) y

cuticulares (TR_{cu}). La TR_{st} está controlada por la conductancia estomática y la TR_{cu} es afectada por las características fisicoquímicas de la superficie de la planta, como el espesor de la cera y su microestructura, que determina en gran medida la permeabilidad de la superficie de la hoja (Xu *et al.*, 1995; Svenningsson, 1988). En 1859 Garreau *et al.*, observaron una correlación positiva entre el espesor de la capa de la cutícula y la reducción de la transpiración, proporcionando así la primera evidencia del papel de la cutícula como una barrera que limita la pérdida de agua por una vía no estomática (Stiles, 1994). De esta manera, bajo un estrés extremo por déficit hídrico el cierre estomático y la conductancia estomática falla, y la pérdida de agua vía cuticular adquiere una importancia significativa (Kosma *et al.*, 2009; Sheperd y Griffiths, 2006).

A la fecha un número considerable de estudios han mostrado que el estrés por déficit hídrico puede incrementar la cantidad de ceras depositadas en la superficie de las hojas de diferentes plantas incluidas: *Arabidopsis*, tomillo, algodón, rosas, chicharo, cacahuete, tabaco y recientemente en algunos cultivos de importancia alimentaria como: avena, arroz, sorgo, alfalfa y trigo. Sin embargo, los resultados sugieren que la cantidad de ceras cuticulares no siempre se correlaciona con una reducción en la tasa de transpiración o un incremento en la tolerancia al déficit hídrico (Islam *et al.*, 2009; Kosma *et al.*, 2009; Cameron *et al.*, 2006; Godwin y Jenks, 2005; Samdur *et al.*, 2003; Jenks *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2001; Bondada *et al.*, 1996; Letchamo y Gosselin, 1996; Jefferson *et al.*, 1989; Jordan *et al.*, 1984; Bengston *et al.*, 1978). No obstante, la inducción en la biosíntesis de ceras, es una respuesta casi universal en plantas expuestas a un estrés (Yang *et al.*, 2011). Así mismo, se ha estudiado la respuesta a un déficit hídrico entre plantas silvestres (*wt*) y plantas mutantes (*cer1*) de factores de transcripción asociados a la biosíntesis de la cutícula o a enzimas biosintéticas, observando una correlación positiva entre la cantidad de cera y la resistencia al estrés hídrico (Bourdenx *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Aharoni *et al.*, 2004).

El grosor de la cutícula varía según la especie vegetal, zona de la planta y edad o estado de desarrollo, ya que aumenta durante el crecimiento y disminuye durante el proceso de maduración y senescencia (Jetter *et al.*, 2006; Stark y Tian, 2006; Jetter *et al.*, 2000). La composición química y la estructura cuticular son generadas por una red metabólica compleja, regulada por factores bióticos y abióticos, para proporcionar un mecanismo de adaptación durante la interacción planta-ambiente (Bernard y Joubès, 2013).

IV.2. HIPOTESIS

Datos preliminares indican que las plantas de *Carica papaya* L. genotipo Silvestre son más tolerantes a un estrés por déficit hídrico, por lo que sería de esperarse que los individuos Silvestres presenten mayor cantidad de ceras que el genotipo Maradol. Adicionalmente se podría esperar que las plantas Silvestre presentasen un perfil de ceras diferente al de las plantas comerciales debido a que las primeras presentan una mayor adaptación al estrés por déficit hídrico.

IV.3. OBJETIVOS

IV.3.1. Objetivo General

- Establecer una posible relación entre la composición y cantidad de ceras totales presentes en los folíolos de diferentes poblaciones de *Carica papaya* L. y su tolerancia al estrés por déficit hídrico.

IV.3.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la cantidad de ceras totales presentes en dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre.
- Obtener el perfil cromatográfico de los extractos cerosos de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre.
- Determinar los componentes principales presentes en el perfil cromatográfico de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre.

IV.4. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.4.1. Material Biológico

El material vegetal utilizado se obtuvo a partir de las semillas de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre colectados en diferentes localidades del Estado de Yucatán (Capítulo III). Las plantas fueron germinadas y trasplantadas en el invernadero del CICY, donde se monitorearon las condiciones ambientales (HR del 70%, DFFF $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y T 30°C). El riego consistió de 30 mL de agua cada tercer día durante los primeros 25 d, mientras que el tiempo restante, el riego fue de 50 mL cada segundo día. Se aplicó una solución nutritiva comercial (Bayfolan® líquido, Bayer) (1 mL L^{-1}) dos veces por semana. A los 90 días de iniciada la germinación, las plantas tuvieron suficiente tejido para llevar a cabo la extracción de ceras totales y su análisis por microscopía electrónica. Los tiempos de exposición al estrés por déficit hídrico evaluados fueron: día 0, 14, 21 y 28 como tiempo de recuperación con riego constante de 1 semana (Figura IV.3). Al final de cada tratamiento, los folíolos situados en la parte intermedia de la planta se cortaron con una navaja a la altura de su base procurando no dañar el tejido. El material colectado fue transportado en bolsas de plástico al Laboratorio de Fisiología Molecular y Vegetal del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), donde fue almacenado a 4°C para su análisis posterior.

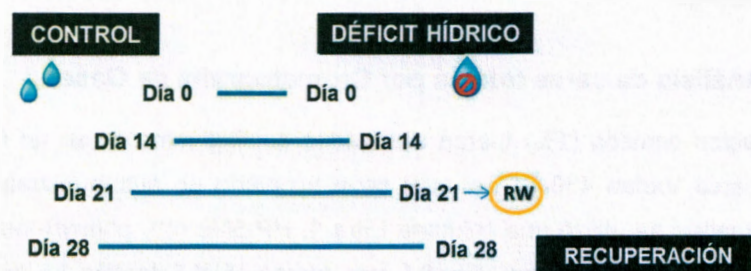


Figura IV.3. Distribución de plantas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, utilizadas en la determinación del tratamiento de estrés por déficit hídrico.

IV.4.2. Extracción de Ceras Totales en folíolos de *Carica papaya*.

Para la extracción de ceras totales en *Carica papaya* L., se modificó el protocolo de extracción de ceras establecido en el Laboratorio de Química Orgánica, CICY para Cocos

nucifera L. (Serralta, 2000). Los foliolos de papaya se doblaron uniendo los extremos a su base, de tal forma que fuese posible sumergir el foliolo en 200 mL de disolvente Hexano (C_6H_{14}) contenidos en un vaso de precipitados de 500 mL, procurando no cubrir el pedúnculo de la hoja. Los foliolos se sumergieron una sola vez por 40 segundos y se dejó escurrir dentro del vaso. El extracto ceroso se obtuvo al eliminar el disolvente a presión reducida utilizando un rota evaporador (Büchi 461); cada extracto se re-disolvió con Diclorometano (CH_2Cl_2) y fue transferido a viales filtrando la solución a través de un tapón de algodón. El disolvente presente en los viales se eliminó dejándolos primero, en una campana de extracción y después se les colocó *in vacuo* hasta peso constante (Gamboa, 1996). Los foliolos utilizados en las extracciones se resguardaron en refrigeración para calcular su área foliar.

IV.4.3. Cuantificación de Área Foliar

El área del foliolo se obtuvo utilizando un digitalizador de imágenes Licor (Li-3100 Area Meter) el cual integra y registra los valores de área (cm^2). El procedimiento es el siguiente: después de la extracción total de ceras, el foliolo se colocó entre dos acetatos los cuales se pusieron en la banda del digitalizador para calcular el área, al final se sumaron los valores obtenidos. Para estimar el rendimiento (mg/cm^2) de las ceras extraídas, se calculó por diferencias de peso la cantidad total de cera extraída (mg) y se dividió entre el área (cm^2) de la hoja.

IV.4.4. Análisis de ceras totales por Cromatografía de Gases

Los extractos cerosos (1%) fueron analizados cualitativamente en un Cromatógrafo de Gases marca Varian 430-GC, el cual tiene acoplado un automuestreador Varian PAL. Para el análisis se utilizó una columna Ultra 1, HP-5Ms (5% phenyl)-methyl polixiloxane, de 25 m de largo, ID 0.32 mm, film 0.5 mm, marca J&W Scientific. La muestra se inyectó con las siguientes condiciones: Temperatura de columna programada: $T_1 = 280\text{ }^{\circ}C$ (5 min), gradiente de $2\text{ }^{\circ}C/min$, $T_2 = 300\text{ }^{\circ}C$ (20 min). Temperatura del Inyector $= 280\text{ }^{\circ}C$ y Temperatura del detector (FID) $= 290\text{ }^{\circ}C$.

IV.4.5. Análisis de ceras por Cromatografía de Gases Masa

Para la identificación de los componentes detectados en cromatografía de gases masa (GC/M) se utilizó un Cromatógrafo de Gases Masas (6890N) acoplado a un detector másico (5975B), ambos marca Agilent Technologies. Para el análisis se utilizó una columna HP-5Ms (5% phenyl)-methyl polixiloxane, de 30 m de largo, ID 0.32 mm, film 0.5 mm, marca J&W Scientific. La muestra se inyectó con las siguientes condiciones: Temperatura de columna programada de: $T_1 = 280\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5min), gradiente de $2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $T_2 = 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20min). Temperatura del Inyector $= 280\text{ }^{\circ}\text{C}$ y Temperatura del detector (FID) $= 290\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV.4.6. Preparación de muestras biológicas para Microscopía

Para la preparación de las muestras biológicas se utilizó como material biológico hojas completamente expandidas, las muestras de los segmentos de la lámina se obtuvieron de la parte media de las hojas en secciones de 1 cm^2 . Para la fijación de la muestra se utilizó como fijador una solución de Glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfato por un tiempo de 48 horas. Posterior a la fijación se procedió a lavar las muestras con un buffer de fosfatos de sodio 0.2 M y pH 7.1 para eliminar por completo los residuos superficiales del fijador. Al terminar con los lavados se empezó con la deshidratación gradual de los tejidos con etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) a diferentes concentraciones (ANEXO IV.I). Una vez deshidratadas las muestras fueron secadas con un Secador a Punto Crítico (TOUSIMIS, modelo SAMDRI 795); después se llevó a cabo el montaje y la metalización (Sputtering) de las muestras con oro utilizando un metalizador (DENTON VACUUM/DESK II) (Kuo, 2008). Una vez recubiertas las muestras fueron observadas con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (Jeol, modelo JSM-6360 LV) del Laboratorio de Microscopía del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

IV.5. RESULTADOS

IV.5.1. Extracción y cuantificación de ceras totales

La extracción total de ceras se realizó por triplicado para cada tiempo de exposición y grupo control en ambos genotipos. El rendimiento (mg cm^{-2}) para cada tratamiento se calculó al dividir la cantidad de extracto ceroso (mg) obtenido entre el área (cm^2) de cada hoja analizada. Morfológicamente las hojas del genotipo Silvestre tuvieron una mayor superficie con un área promedio de 120 cm^2 y con un aspecto más brillante que las hojas de Maradol que en promedio tuvieron un área menor a los 100 cm^2 . En el Cuadro IV.2 se presenta el promedio de los valores obtenidos para ambos genotipos en cada uno de los tratamientos.

De la extracción de ceras totales realizadas con Hexano (C_6H_{14}) se observó que al día 0 la cantidad de extracto obtenido fue similar en ambos genotipos, sin embargo, al día 14 de iniciado el tratamiento, se observó que el genotipo Silvestre tuvo mayor cantidad de extracto ceroso con un rendimiento total de $0.0048 \text{ mg cm}^{-2}$, en comparación con Maradol que tuvo un rendimiento de tan sólo $0.0015 \text{ mg cm}^{-2}$ en el mismo tiempo. Al día 21 de estrés por déficit hídrico se obtuvieron valores similares de rendimiento en ambos casos, Maradol tuvo un rendimiento de $0.0082 \text{ mg cm}^{-2}$ y Silvestre de $0.0088 \text{ mg cm}^{-2}$. Finalmente durante el periodo de recuperación, se observó que la cantidad de ceras presentes en ambos genotipos continuó incrementando hasta alcanzar un rendimiento de $0.0110 \text{ mg cm}^{-2}$ en Maradol y $0.01330 \text{ mg cm}^{-2}$ en Silvestre (Figura IV.4).

La diferencia observada en cuanto a la cantidad de ceras extraídas, sugiere que el genotipo Silvestre tiene una mayor capacidad de acumular ceras en respuesta a un estrés, lo que puede relacionarse con la capacidad de ser más tolerante ante un estrés por déficit hídrico en comparación con Maradol. Otro punto importante, es lo ocurrido en las plantas control, donde se vio que incluso en condiciones de riego, el genotipo Silvestre tiene un contenido de ceras mayor que Maradol, lo que sugiere que la planta está predispuesta genéticamente a acumular mayor cantidad de ceras y sólo necesita un estímulo para aumentar la producción de las mismas.

Cuadro IV.2. Valores medios obtenidos de la extracción de ceras totales en *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. La desviación estándar corresponde a 3 réplicas por cada tratamiento. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento.

Maradol

Tratamiento	Extracto Ceroso (mg)	Área (cm ²)	Rendimiento Total (mg/cm ²)	Desviación Estándar
Día 0	0.0047	82.7778	0.0001	0.0000
Día 14	0.1089	76.9567	0.0015	0.0017
Día 21	0.6250	76.8811	0.0082	0.0010
RW Día 28	0.6211	56.3322	0.0110	0.0004

Silvestre

Tratamiento	Extracto Ceroso (mg)	Área (cm ²)	Rendimiento Total (mg/cm ²)	Desviación Estándar
Día 0	0.0108	176.7233	0.0001	0.0000
Día 14	0.5797	119.5689	0.0048	0.0010
Día 21	0.9482	114.8600	0.0088	0.0010
RW Día 28	1.5574	118.0000	0.0130	0.0004

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Petit-Jiménez *et al.*, (2007) quienes observaron los cambios en la composición y estructura de la cutícula en frutos de mango (*Mangifera indica*) durante su crecimiento, desarrollo y almacenamiento en tres variedades comerciales. Ellos reportaron diferencias entre la cantidad de ceras extraídas para cada variedad dependiendo de la fase de desarrollo en la que se encontraban. De esta forma concluyen que la síntesis de la cutícula está controlada por factores genéticos, fisiológicos, climatológicos y de manejo, tanto en campo como en post-cosecha. Y que además, todos estos factores influyen en la composición y ultra estructura de las ceras epicuticulares, por lo que no se puede generalizar sobre la morfología de las mismas y la composición química para una especie en particular (Tafolla *et al.*, 2013).

En la Figura IV.4, se graficaron los rendimientos presentados anteriormente, se observa que las plantas expuestas al estrés por déficit hídrico mostraron una tendencia de acumular mayor contenido de ceras. Esto refuerza la idea que la acumulación de ceras en las plantas es una respuesta general ante un estrés ya sea de tipo biótico o abiótico (Yang *et al.*, 2011). En este experimento en particular, se observó que las plantas control de ambos genotipos tienen una tendencia de acumular ceras en función del tiempo, siendo mayor en las plantas Silvestre (A). Por el contrario, ante un estrés por déficit hídrico,

ambos genotipos aumentaron su contenido de ceras en los primeros 14 días de iniciado el tratamiento. En el día 21 sin riego se observó una mayor acumulación de ceras en las plantas Silvestre con un 71% en comparación de Maradol que solo tuvo un 57% de ceras totales. Una vez reincorporado el riego (RW) la acumulación de ceras aumentó en ambos casos, quizás como un mecanismo de defensa adicional (B). En la gráfica comparativa (C), se observa claramente que existe una mayor acumulación de ceras en las plantas Silvestre al día 21 de déficit hídrico en comparación de Maradol. Estos resultados sugieren que el genotipo Silvestre tiene una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico dado, entre otros parámetros fisiológicos, por la acumulación de ceras totales que reducen la pérdida de agua por transpiración.

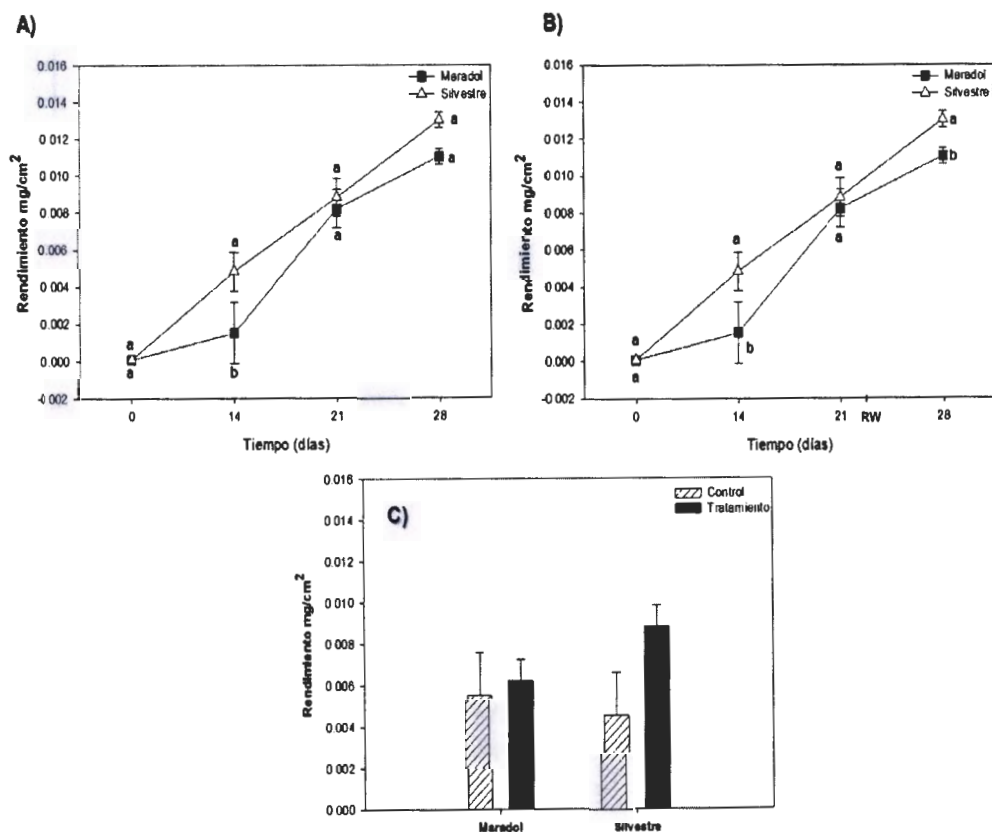


Figura IV.4. Rendimiento de ceras totales extraídas con Hexano (C_6H_{14}), en individuos de *Carica papaya* L. de ambos genotipos: **A)** Plantas control **B)** Plantas expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (14 y 21 d) y 1 semana de restablecido el riego (28 d) **C)** Rendimiento total de ceras obtenidos al día 21. Para el grupo control, el riego consistió en 50 mL cada 2 días.

Los datos son el resultado de 1 repetición con 3 réplicas cada una. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento.

Hasta el momento, en la literatura se tienen diversos reportes que señalan cambios en la cantidad y tipo de ceras totales en respuesta al ataque de patógenos, protección contra rayos UV-B y en respuesta al estrés por déficit hídrico. Sí bien es cierto que muchos estudios señalan que ante un estrés por déficit hídrico la cantidad total de ceras aumenta, lo que reduce la permeabilidad de la membrana y por ende la transpiración, que en conjunto conduce a un aumento en la tolerancia al estrés. Muchos autores coinciden en que esta propiedad de la cutícula no depende únicamente de su grosor, sino por el contrario, responde a los cambios de la estructura cuticular, de la variación de sus componentes (principalmente lípidos solubles cuticulares) y de las proporciones en que éstos se encuentran (Schreiber, 2005; Knoche *et al.*, 2004; Matas *et al.*, 2004; Rogiers *et al.*, 2004; Vogg *et al.*, 2004; Verardo *et al.*, 2003; Riederer y Schreiber, 2001; Hauke y Schreiber, 1998).

Lo antes mencionado se vuelve crucial para nuestro estudio, pues sí bien, encontramos un aumento en la cantidad de ceras totales, conocer la composición estructural de las ceras es fundamental si se busca correlacionar correctamente el contenido de ceras con una tolerancia al estrés por déficit hídrico. Por lo anterior, en este estudio se procedió a analizar el perfil cromatográfico de los extractos cerosos obtenidos para cada uno de los tiempos evaluados, con el objetivo de comparar los perfiles y encontrar posibles diferencias en cuanto el número de componentes presentes e identificar la naturaleza de cada uno.

IV.5.2. Perfiles Cromatográficos

Al analizar por cromatografía de gases (CG) cada uno de los extractos cerosos obtenidos de ambos genotipos, se observó la presencia del mismo número de componentes (6). Lo que sugiere que el perfil de ceras es cualitativamente similar con diferencias cuantitativas, ya que sólo se observan variaciones en la abundancia de cada componente. En la Figura IV.5 se presentan los cromatogramas obtenidos del análisis por CG de los extractos

correspondientes a las muestras representativas de cada genotipo al tiempo 21 de déficit hídrico.

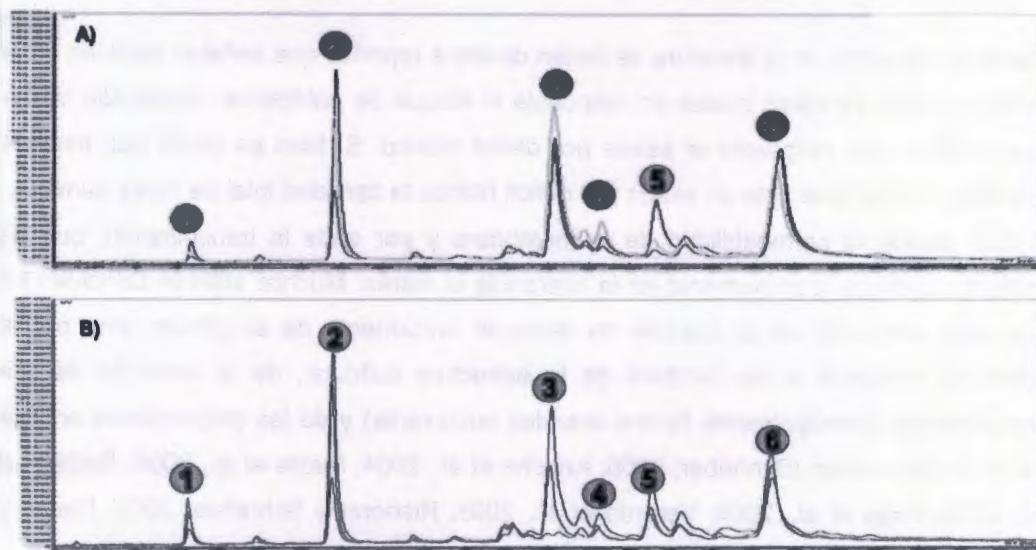


Figura IV.5. Cromatogramas representativos obtenidos mediante cromatografía de gases al día 21 de cada genotipo **A)** Maradol y **B)** Silvestre, los números representan los componentes nombrados de acuerdo a su tiempo de retención, como: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En los cromatogramas se puede observar la presencia de seis componentes principales nombrados: componente 1, componente 2, componente 3, componente 4, componente 5 y componente 6 de acuerdo al tiempo de retención (RT) en que fueron apareciendo. Los 6 componentes se encuentran presentes en todos los extractos cerosos analizados, observándose variación únicamente en la abundancia de cada uno. En base a estos resultados, se procedió a analizar las mismas muestras en un Cromatógrafo de Gases-Masa (CG/MS) con la finalidad de: Corroborar los perfiles cromatográficos con un método más sensible e Identificar la posible estructura de los componentes presentes en estos perfiles. En la Figura IV.6, se presentan los perfiles cromatográficos correspondientes a muestras representativas de cada genotipo al tiempo 21 de déficit hídrico, obtenidos mediante CG/MS. Los perfiles son comparables con los presentados en la Figura IV.5, en ambos métodos se confirma la presencia de los 6 componentes ya mencionados con variaciones únicamente en su abundancia.

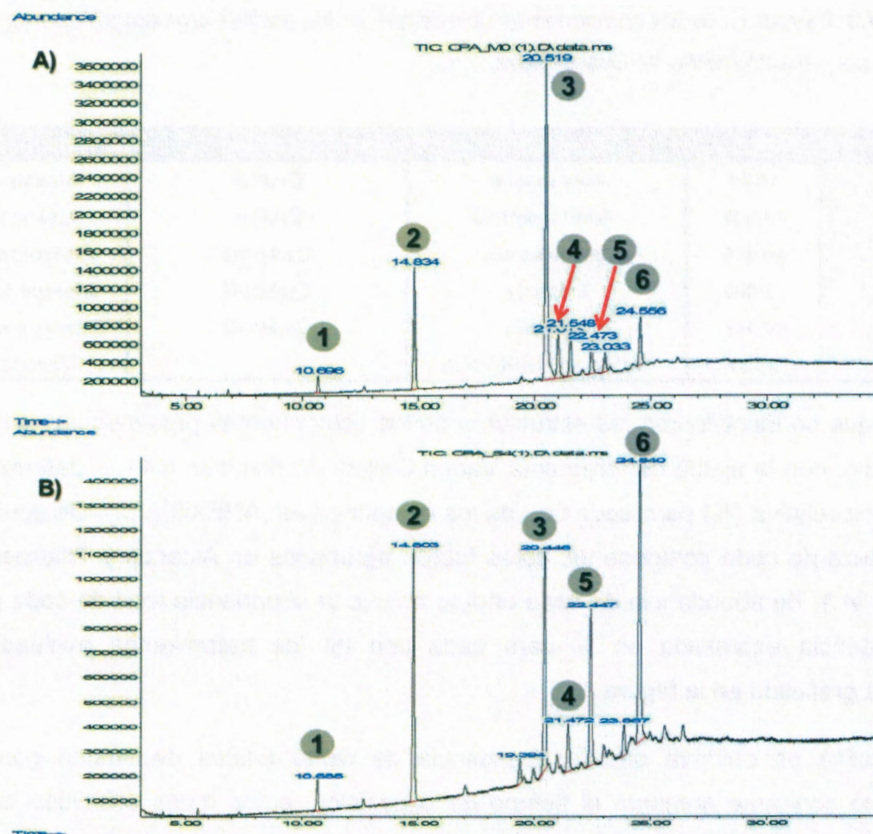


Figura IV.6. Cromatogramas representativos obtenidos por Cromatografía de Gases-Masa al día 21 de estrés para cada genotipo A) Maradol y B) Silvestre, los números representan los componentes 1, 2, 3, 4, 5 y 6 según tiempo de retención.

Se obtuvieron para cada uno de los picos señalados en los cromatogramas, los patrones de fragmentación y de acuerdo a su análisis se identificó la estructura probable de cada uno, con excepción del componente 6, para el cual no fue posible determinar su estructura (ANEXO IV.3). Los componentes identificados fueron agrupados de acuerdo a su estructura en Alcanos y Triterpenos, la estructura de cada uno, que ha sido corroborada con el uso de estándares, se presenta en el Cuadro IV.3. Nuestros resultados indican la presencia de Alcanos y Triterpenos como los componentes mayoritarios de las ceras totales, lo que es consistente con lo reportado en la literatura, donde se señala a estos grupos como los principales componentes de las ceras epicuticulares (Kunst y Samuels, 2003).

Cuadro IV.3. Estructura de los componentes detectados en los perfiles cromatográficos de *Carica papaya L.* por espectrometría de Gases-Masa.

Componente	RT	Estructura	Fórmula	Grupo
1	10.69	Nonacosano	$C_{29}H_{60}$	Alcanos
2	14.828	Hentriacontano	$C_{38}H_{78}$	Alcanos
3	20.495	β -Amirenona	$C_{30}H_{48}O$	Triterpenos
4	21.002	β -Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	Triterpenos
5	22.466	α -Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	Triterpenos
6	24.53	Alcano no identificado		Alcanos

Una vez que se identificaron las estructuras de los componentes presentes en las ceras se procedió, con la ayuda del programa Varian Galaxy Workstation 6.41, a determinar la abundancia relativa (%) para cada uno de los componentes (ANEXO IV.2). De acuerdo a la naturaleza de cada componente, éstos fueron agrupados en Alcanos y Triterpenos, y sumando el % de abundancia de cada uno se obtuvo la abundancia total de cada grupo. La abundancia expresada en % para cada uno de los tratamientos evaluados se encuentra graficada en la Figura IV.7.

En la gráfica se observa que la abundancia de ceras totales de ambos genotipos incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición, estos datos coinciden con los valores de rendimiento ($mg\ cm^{-1}$) presentados anteriormente (Fig. IV.4). Para el caso de las ceras totales se observa que al día 0, el % de ceras fue similar en ambos genotipos, sin embargo, al día 14 de estrés se registró un aumento en el % de ceras en Silvestre con un 125%, no así en Maradol que registró un valor de 105%. En el tiempo máximo de estrés (21 d) la abundancia en la cantidad de ceras fue ligeramente mayor en Silvestre con 130% comparado con Maradol que tan solo tuvo 120%. Durante el tiempo de recuperación se observó que la cantidad de ceras se mantiene sin cambios en las plantas Maradol, no así en Silvestre que continuó aumentando su % de ceras totales (Figura IV.7A).

Por otra parte, la abundancia del grupo de los Alcanos fue similar al tiempo 0, sin embargo, una vez iniciado el experimento el contenido de Alcanos disminuyó en las plantas Maradol de un 70 a 65%, mientras que en Silvestre registró un aumento de 78 a 80%. Al día 21 de estrés, el decremento en la cantidad de Alcanos presentes en Maradol alcanzó los valores más bajos con un 50%, contrariamente a Silvestre que tuvo una

abundancia de Alcanos de un 100%. En el periodo de recuperación, la cantidad de Alcanos presentes en el genotipo Maradol disminuyó a 48%, mientras que en Silvestre alcanzó el valor más alto con un 140% (Figura IV.7B).

Finalmente, para el grupo de los Triterpenos se observó al tiempo 0 un % de abundancia similar en ambos genotipos, mismo que se mantuvo sin cambios aún después de suspender el riego por 7 días, 20 y 25% para el caso del genotipo Maradol y Silvestre respectivamente. Sin embargo al día máximo de estrés, se observó un aumento en el % de Triterpenos en el genotipo Silvestre a 50%, no así en Maradol que tuvo una abundancia del 30%. Finalmente, durante el periodo de recuperación, la abundancia de Triterpenos aumentó a 50% en el genotipo Maradol, mientras que en el Silvestre la abundancia de 50% se mantuvo sin cambios (Figura IV.7C)

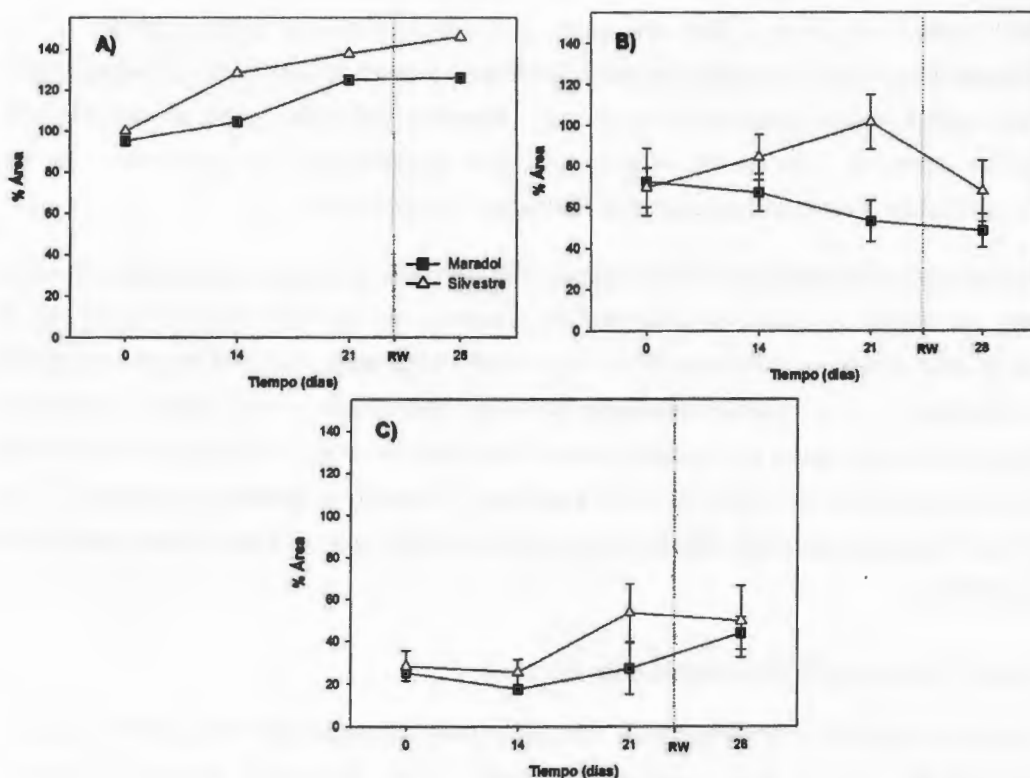


Figura IV.7. Principales grupos detectados mediante CG/MS en hojas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. **A)** Ceras totales. **B)** Alcanos. **C)** Triterpenos. Las mediciones de los extractos cerosos se realizaron tomando hojas del estrato medio de la planta en los diferentes tiempos. Los datos son el resultado de 1 repetición con 3 réplicas cada una. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 21 de iniciado el tratamiento.

En la gráfica anterior se destacan dos puntos importantes, el primero es la tendencia de aumento en la cantidad de ceras, que es consistente con los valores obtenidos de los rendimientos totales (Figura IV.4). El segundo punto y quizás el más importante, es el comportamiento que presentaron los Alcanos en los tiempos de estrés por déficit hídrico, específicamente al día máximo de estrés (21 d). En este tiempo los Alcanos parecen estar en una relación de 2:1, comparando su % de abundancia en el genotipo Silvestre y Maradol, lo anterior sugiere que al ser el componente mayoritario en las ceras de las plantas expuestas al estrés, podría estar involucrado en la respuesta a un estrés por déficit hídrico en papaya. Por otra parte, el % de abundancia para el grupo de los Triterpenos aumentó en ambos genotipos conforme avanzó el tiempo de exposición, este incremento fue más evidente en el genotipo Silvestre, sin embargo no se observa una relación como el caso de los Alcanos que nos sugieran que la acumulación de los Triterpenos se debe a una respuesta al estrés por déficit hídrico.

Los resultados presentados en este apartado indican que en general, el genotipo Silvestre tiene una mayor capacidad de acumular ceras totales en respuesta a un estrés por déficit hídrico en comparación de Maradol, lo que puede relacionarse con una mayor capacidad de tolerancia y una mejor recuperación al estrés. Sin embargo, para poder constatarlo visualmente y descartar que pudiera haber diferencias en el tipo de cristales cerosos; se procedió a analizar las hojas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, expuestas a los diferentes tratamientos por déficit hídrico, mediante técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido.

IV.5.3. Microscopía Electrónica de Barrido

Las fotomicrografías obtenidas con el Microscopio Electrónico de Barrido se presentan en las Figuras IV.8 y IV.9, que corresponden a la superficie abaxial y adaxial respectivamente. En ambos casos los incisos (**A-B**) pertenecen al genotipo Maradol y (**D-**

E) al genotipo Silvestre. Las muestras analizadas fueron tomadas de la parte media de las hojas completamente expandidas situadas en el estrato medio de la planta.

En todos los casos, las ceras epicuticulares de las hojas analizadas presentan una forma predominante, siendo la única diferencia la cantidad de cristales presentes. De acuerdo a la clasificación realizada por Bourth *et al.*, (1998), los cristales cerosos observados son denominados cristaloides, los cuales presentan bordes irregulares que sobresalen de la capa de cera ubicua. Los cristaloides son característicos de ciertos taxa y su simetría es más o menos constante y aunque presentan una distribución regular en algunas especies puede variar dependiendo de las condiciones del medio ambiente que influyen en la micromorfología de las ceras (Engel y Barthlott, 1988). En el caso de las muestras analizadas, se observa una distribución en forma de plaquetas irregulares con los bordes poco definidos alrededor de los estomas y cubriendo toda la epidermis. No se observaron diferencias entre los cristales cerosos situados en la parte abaxial y adaxial de las hojas analizadas.

La Figura IV.8 corresponde a la deposición de las ceras epicuticulares en la parte abaxial de la lámina foliar. Para el caso del genotipo Maradol (**A-C**) se observa en el inciso **A**, la deposición de las ceras en una planta control donde los cristales cerosos se encuentran alrededor de los estomas en condiciones de riego constante, el inciso **B**, corresponde a una hoja bajo estrés por déficit hídrico de 21 días, en ella se distingue que la cantidad de cristales cerosos incrementa notablemente en los bordes de los estomas y en la epidermis, la mayoría de ellos se encuentran aglomerados y es difícil distinguir los bordes de las plaquetas, finalmente en el inciso **C**, se observa una hoja en periodo de recuperación, en donde la cantidad de cristales cerosos disminuye en comparación de la hoja estresada e incluso de la control, esto puede deberse a que la hoja tomada para la fijación era la remanente por lo que su tiempo de exposición al estrés fue menor que el de las demás hojas. Para el caso del genotipo Silvestre (**D-F**) se observa que la cantidad de ceras en la planta control (**D**) es mayor en comparación con la planta control de Maradol (**A**), y para la planta bajo estrés hídrico de 21 días (**E**) la cantidad de ceras incrementa visiblemente siendo mayor en el genotipo Silvestre en comparación con Maradol (**B**). Por último, el inciso **F**, corresponde a una planta en periodo de recuperación de 1 semana con riego, la cantidad de ceras es menor que el inciso **E**, pero tiene cantidades similares al de la planta control **D**.

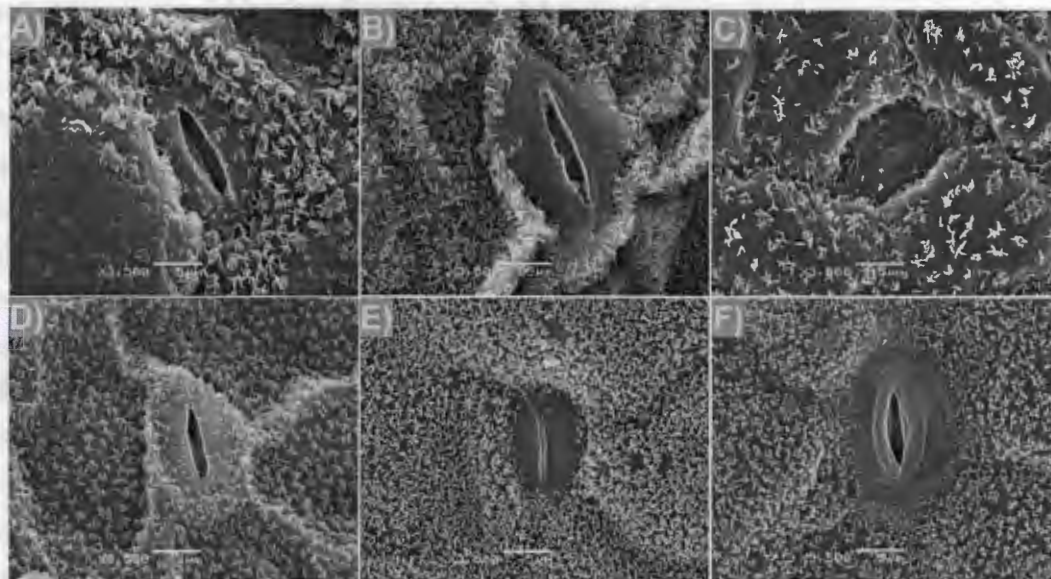


Figura IV.8. Deposición de ceras epicuticulares en la superficie abaxial de la lámina foliar de *Carica papaya* L. (A-C) Maradol y (D-F) Silvestre, expuestas a diferentes tratamientos: A) y D) Planta Control; B) y E) Déficit Hídrico 14 días; C) y F) Recuperación día 21. Escala de barra= 5 μ m.

En la parte adaxial de la lámina foliar (Figura IV.9), no fue posible observar presencia de estomas en ninguna de las muestras lo que indica que *Carica papaya* L. es una especie hipoestomática, es decir la mayoría de sus estomas se encuentran en la parte abaxial (Envés) de la hoja, lo anterior fue corroborado con muestras analizadas en microscopio óptico tomando varios sitios de la hoja y concuerda con lo reportado por Pares *et al.*, (2008) quienes evaluaron el efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática en *C. papaya* L. (Anexo IV.3). En cuanto a la forma de las ceras, fue el mismo tipo cristalino descrito en la parte abaxial, siendo la única diferencia la cantidad presente de estos cristales en cada una de las muestras, que fue mayor en los incisos B y E que corresponden a las hojas sometidas a estrés hídrico por 21 días. De los dos genotipos analizados, el Silvestre es el que morfológicamente presenta un mayor contenido de ceras, lo anterior se correlaciona con los rendimientos de ceras totales extraídos en cada uno de los tiempos y con los % de Área mencionados anteriormente (Figura IV.4 y Figura IV.7).

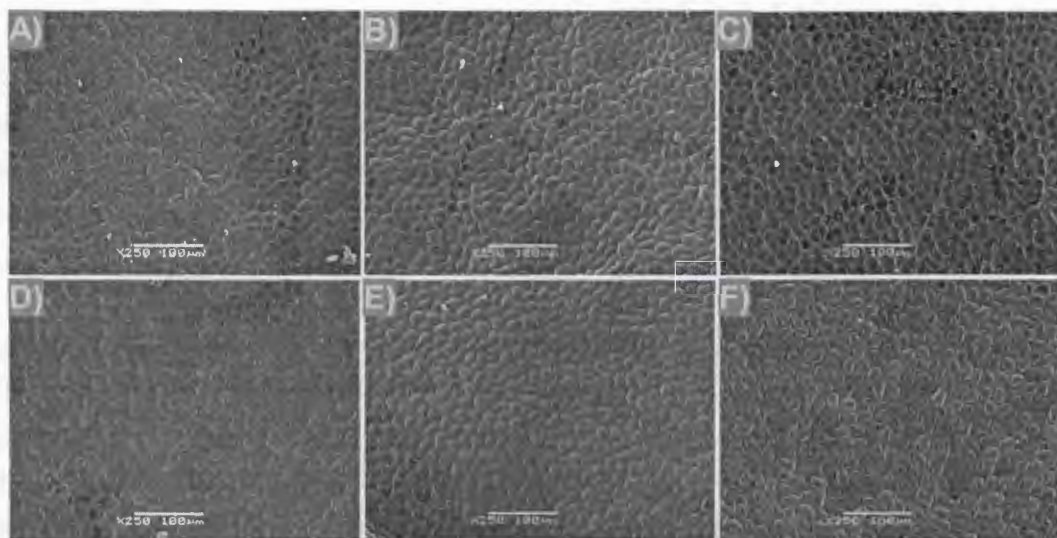


Figura IV.9. Deposición de ceras epicuticulares en la superficie adaxial de la lámina foliar de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, expuestas a diferentes tratamientos: **A)** y **D)** Planta Control; **B)** y **E)** Déficit Hídrico 14 días; **C)** y **F)** Recuperación día 21. Escala de barra= 100 µm.

A la fecha no se tienen reportes en la literatura sobre el tipo de ceras presentes en las hojas de *Carica papaya* L., por lo que en ésta tesis se reporta por primera vez la caracterización morfológica de las ceras epicuticulares presentes en los folíolos de papaya en plantas control y ante un estrés por déficit hídrico. La micro morfología de las hojas revelaron una estructura irregular de tipo cristalino presente en las plantas control; y bajo condiciones de estrés por déficit hídrico, mantiene su estructura variando únicamente en la cantidad total de cristales presentes. Estas variaciones se ven reflejadas en los rendimientos de los extractos cerosos obtenidos, que indican un aumento en la cantidad de ceras, siendo mayor en el genotipo Silvestre al día 21 de suspendido el riego, lo que puede relacionarse a una mayor tolerancia al estrés evaluado.

IV.6. DISCUSIÓN

Las propiedades físicas y químicas de las ceras cuticulares determinan muchas de las funciones vitales para la vida de la planta. La cutícula restringe la pérdida de agua vía no estomática, protege a la planta de una radiación ultravioleta, reduce la acumulación de polvo, polen y contaminantes del aire (Barthlott y Neinhuis, 1997; Kerstiens, 1996; Barnes *et al.*, 1995; Reicosky y Hanover, 1978). Adicionalmente, se cree que la superficie cerosa juega un papel importante en la defensa de la planta al ataque de patógenos y hongos, además se ha visto que participa en una gran variedad de interacciones planta-insecto (Jenks *et al.*, 1994). De acuerdo a Isaccson *et al.*, (2009) el contenido y composición de ceras totales varía según la especie y tejido analizado. En el presente estudio se analizaron solamente hojas completamente expandidas provenientes del estrato medio de las plantas de *Carica papaya* L. de dos genotipos: susceptible (Maradol) y uno tolerante (Silvestre).

Para la extracción de las ceras totales presentes en los folíolos de *C. papaya* L., se utilizó un solvente de baja polaridad (Hexano), ya que varios autores señalan que las ceras epicuticulares son productos hidrofóbicos que pueden ser removidos de la superficie de las plantas mediante una breve inmersión en solventes orgánicos de baja polaridad como el Hexano (Samuels *et al.*, 2008; Jenks *et al.*, 2002). El tiempo de inmersión fue corto (40 s) para evitar extraer componentes de la cutina. Los resultados obtenidos de la cuantificación de ceras totales en los dos genotipos analizados sugieren que, Silvestre es capaz de acumular mayor contenido de ceras con 71% en comparación al 57% de Maradol (Figura IV.4B), ésta diferencia puede relacionarse con una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico o mayor resistencia al ataque de patógenos por parte del genotipo Silvestre. Aunado a ello, se observó que sí bien en ambos genotipos, hubo un aumento en la cantidad de ceras totales, el Silvestre logró acumular un mayor contenido de ceras en un tiempo menor (0-7 días) a diferencia de Maradol que presentó un aumento gradual en la cantidad de ceras a partir de los 7-14 días de iniciado el experimento. El aumento en la cantidad de ceras en periodos cortos de tiempo de 7 días coincide con lo reportado por Premachandra *et al.*, (1991), quienes señalan que la deposición de las ceras en coníferas puede ocurrir rápidamente en pocos días debido a diferentes factores ambientales (Premachandra *et al.*, 1991; Bengston *et al.*, 1978).

Numerosos estudios han demostrado que el estrés por déficit hídrico aumenta la cantidad de ceras depositadas en la superficie de las hojas en diferentes plantas, incluidas: *Arabidopsis*, algodón, cacahuate, chícharo, rosas, tabaco, tomillo y recientemente en algunos cultivos de importancia alimentaria: avena, arroz, alfalfa, sorgo y trigo. (Islam *et al.*, 2009; Kosma *et al.*, 2009; Cameron *et al.*, 2006; Godwin y Jenks, 2005; Samdur *et al.*, 2003; Jenks *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2001; Bondada *et al.*, 1996; Letchamo y Gosselin, 1996; Jefferson *et al.*, 1989; Jordan *et al.*, 1984; Bengston *et al.*, 1978). Estudios realizados en plantas de *Arabidopsis thaliana*, *Cocos nucifera* L., *Oryza sativa* sobre la composición química y morfología de las ceras epicuticulares han sido utilizados para correlacionar la naturaleza y la composición química de las ceras, con la susceptibilidad de la planta a un ataque de insectos o un daño por agentes químicos (Bourdenx *et al.*, 2011 Rashotte *et al.*, 1997; García *et al.*, 1995). Sin embargo, muchos autores coinciden en que la cantidad de ceras no siempre se correlaciona con una tasa de transpiración menor o un incremento en la tolerancia al déficit hídrico (Goodwing y Jenks, 2005). La resistencia que ofrece la cutícula a los daños mecánicos, a la difusión de gases, a los cambios en permeabilidad al agua y a la penetración de microorganismos, no depende específicamente de su grosor, sino más bien de los cambios de la estructura cuticular, de la variación de sus componentes (principalmente lípidos solubles cuticulares) y las proporciones en que éstos se encuentren (Yeats, 2012; Leide, 2011; Kerstiens, 2006; Schreiber, 2005; Knoche *et al.*, 2004; Matas *et al.*, 2004; Rogiers *et al.*, 2004; Vogg *et al.*, 2004; Verardo *et al.*, 2003; Riederer y Schreiber, 2001; Hauke y Schreiber, 1998). Por lo tanto, en base a los rendimientos totales obtenidos, no es posible determinar que la cantidad de ceras presentes en las hojas de *C. papaya* L. del genotipo Silvestre estén relacionadas con una mayor tolerancia por parte de la planta.

Para responder correctamente a la interrogante sobre, si existen diferencias en el tipo y contenido de los componentes presentes en los perfiles cerosos de los genotipos Maradol y Silvestre, se obtuvieron los perfiles cromatográficos por CG para cada uno de los extractos analizados en los tiempos evaluados. Los resultados indican que los perfiles son cualitativamente similares, es decir tienen el mismo número de componentes, difiriendo únicamente en la abundancia de los mismos, lo que sugiere que son estas diferencias en la abundancia de los componentes lo que ayuda a la tolerancia al estrés por déficit hídrico en el genotipo Silvestre. Para poder identificar la estructura probable de cada

componente, se realizó un segundo análisis, ahora por CG/MS y en base a los patrones de fragmentación obtenidos para cada pico se determinó que los componentes son en su mayoría Alcanos y Triterpenos, ambos característicos de las ceras cuticulares. En cuanto la abundancia de cada componente, se observó que en el genotipo Maradol hubo un decremento en la cantidad de Alcanos en los tiempos 0 a 21, que cayó de un 70% hasta un 50% al día 21; por el contrario el genotipo Silvestre presentó un incremento en la cantidad total de Alcanos en este mismo periodo, que fue de 70% hasta alcanzar un 100% al día 21. Por el contrario, los Triterpenos presentaron un comportamiento similar en ambos genotipos, que se vio reflejado en una disminución en la abundancia de estos componentes. Es importante señalar que el comportamiento de los Alcanos en el tiempo máximo de estrés (día 21), parece tener una relación de 2:1 entre Silvestre y Maradol, lo que sugiere que es la abundancia de los Alcanos lo que confiere en el genotipo Silvestre la tolerancia al estrés.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, se ha observado que en hojas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a un estrés por déficit hídrico, los cambios más notables en la composición de las ceras fueron apreciadas en la cantidad de Alcanos. Los componentes cuticulares como los Alcanos, Alcoholes y Aldehídos han mostrado conferir, en una membrana artificial, una mayor resistencia a la difusión de agua en comparación de los Ácidos Grasos de cadena larga, Triterpenoides y Ácido Usosilico, en donde se observó menor resistencia a la difusión del líquido (Grncarevic y Radler, 1967). Por lo tanto, un incremento en la cantidad de los Alcanos ante un estrés ambiental sugiere que la síntesis de compuestos alifáticos de cadena lineal son la clave en la respuesta al estrés (Kosma *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Parsons *et al.*, (2012), correlaciona los cambios en la composición de la cutícula con la pérdida de agua durante la post-cosecha en el fruto de pimiento (*Capsicum annuum* L.), concluyendo que las cadenas alifáticas lineales forman barreras cuticulares más impermeables que los complejos basados en isoprenoides, concluyendo que los cambios en la composición estructural en la cutícula, en especial en los Alcanos ayudan en la tolerancia a un tipo de estrés.

Nuestros resultados coinciden con el aumento en la cantidad de Alcanos señalado por Kosma *et al.* (2009) en las hojas de *A. thaliana* ante un estrés por déficit hídrico. Además, la relación 2:1 observada al día 21 (tiempo máximo de estrés) entre ambos genotipos, sugieren que el aumento en la tolerancia al estrés por déficit hídrico por parte del genotipo

Silvestre se debe al incremento en la cantidad de Alcanos presentes en las ceras, que en conjunto reducen la difusión de agua a través de la membrana, en comparación a Maradol, en donde se observó un decremento en la cantidad de alcanos de 70% al día 0 a 50% a medida que el estrés por déficit hídrico aumentó, lo que se refleja en una tolerancia menor al estrés por déficit hídrico. Finalmente, nuestros datos indican que los Triterpenos se encuentran presentes en menor cantidad en comparación a los Alcanos, lo que sugiere que el cambio en la permeabilidad de la membrana está dado en principio por la abundancia de los Alcanos.

Generalmente, los cultivares de papaya se distinguen por el número de hojas totales, el número de lóbulos en los márgenes de las hojas, la forma de hoja, color del pecíolo de la hoja, el tipo de estomas y la estructura de las ceras sobre la superficie de la hoja (Teixeira *et al.*, 2007). En el presente estudio se realizó la caracterización de la estructura de los cristales cerosos de ambos genotipos expuestos a los diferentes tratamientos por déficit hídrico. Se observó que la micro morfología de los cristales fue la misma en todos los casos, siendo su única variación la abundancia de los mismos por lo que no se puede correlacionar el tipo de cera a un aumento en la tolerancia al estrés por déficit hídrico. Caso contrario a lo reportado por Ni Yu *et al.*, (2014), que estudiaron los efectos de la radiación UV-B sobre las hojas de diferentes edades de *Brassica napus*, encontrando que la micro morfología de los cristales cerosos difiere en las muestras expuestas al estrés en relación a los grupos control, la forma de los cristales cerosos en los grupos control eran de tipo varillas cristaloides con bordes bien definidos y separados entre ellos, por el contrario en los tratamientos los cristales cerosos estaban fusionados en una placa que cubría los estomas, los autores sugieren que esta distribución de las ceras es una respuesta al estrés por la radiación UV-B.

Actualmente, en la literatura se tienen diversos estudios sobre la composición de las ceras en frutos: mandarina (*Citrus reticulata* Ex. Tanaka, cv Nules) (Báez *et al.*, 1993); mango (*Mangifera indica* L.) (Petit *et al.*, 2007); pimienta (*Capsicum annum* L.) (Parsons *et al.*, 2012); tomate (*Solanum lycopersicum*) (Yeats *et al.*, 2010), etc.; pero generalmente evalúan la composición de ceras en relación al manejo post-cosecha de los frutos y no durante la maduración. En el caso *Carica papaya* L., a la fecha, se tienen estudios sobre el contenido de ceras en los frutos maduros (Acosta *et al.*, 2001), por lo que la identificación de los componentes presentes en las hojas de dos genotipos de *C. papaya*

L. Maradol y Silvestre en respuesta a un estrés por déficit hídrico, brinda información importante que nos ayuda a correlacionar las funciones biológicas de la cutícula con su composición química. En este estudio, por ejemplo, la presencia mayoritaria de los Alcanos en el genotipo Silvestre sugiere su participación en la tolerancia al estrés por déficit hídrico, al reducir la permeabilidad de la membrana, que al ser extrapolada a los valores de transpiración (E) presentados en el Capítulo III, en donde se observó que a potenciales hídricos menores, la tasa de transpiración se redujo, probablemente se deba en parte al aumento en la cantidad de Alcanos presentes en la membrana. Sin embargo, en este punto es impreciso definir si la baja en la tasa de transpiración está dada solamente por la transpiración cuticular más que por la vía estomática.

IV.7. CONCLUSIONES

- En la presente tesis se reporta por primera vez la micro morfología de las ceras epicuticulares de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, observándose que el tipo de cristales cerosos son similares en ambos casos y no presentan cambios en su estructura ante un estrés por déficit hídrico, siendo la única diferencia la cantidad de ceras depositadas en la superficie abaxial y adaxial. Concluyendo así que el tipo de cristal ceroso no es determinante en la tolerancia al estrés hídrico, no así la cantidad de ceras totales extraídas en hojas de *C. papaya* L.
- Se analizaron los perfiles cromatográficos de todos los extractos cerosos, observando que los perfiles solo presentan diferencias cuantitativas para cada uno de los componentes detectados. De acuerdo al análisis por CG/MS se encontró que las hojas jóvenes de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre presentan en su mayoría Alcanos y Triterpenos. La abundancia del 100% de Alcanos en el genotipo Silvestre en comparación al 50% de Maradol al tiempo máximo de estrés, sugieren que es la abundancia de este grupo lo que confiere una mayor tolerancia al estrés por parte del genotipo Silvestre. Por otra parte, la presencia de Triterpenos en menor cantidad al día 21 que para Silvestre fue de (55%) y para Maradol de (25%) concuerdan con el hecho de que éste grupo participa en menor grado en la formación de las barreras cuticulares más impermeables.
- Los resultados obtenidos de la extracción de ceras totales en las hojas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, indican que el genotipo Silvestre presenta mayor capacidad para inducir la biosíntesis de ceras con un 71% de rendimiento total en comparación de Maradol con un 57% al día 21 de iniciado el estrés por déficit hídrico.
- Tomando los valores de transpiración reportados en el Capítulo III y con base a los rendimientos de extracto ceroso obtenido para cada genotipo; se puede concluir de manera categórica que el genotipo Silvestre tiene una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico, siendo su principal respuesta el aumento en la cantidad de ceras depositadas en hojas que ayudan a reducir la transpiración gracias al alto

contenido de Alcanos, que reducen la permeabilidad de la membrana y evitan la pérdida de agua.

- Finalmente, en este trabajo se han establecido las bases para estudios posteriores en el que no sólo se comparen los perfiles cromatográficos de diferentes genotipos de *C. papaya* L. expuestas a un estrés por déficit hídrico, sino que además se puede evaluar estos cambios bajo diferentes condiciones ambientales e incluso evaluar la cantidad de ceras presentes en los estados de maduración de los frutos de *C. papaya* L.

IV.8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M., D. Nieto-Ángel, J.L. Domínguez-Álvarez y F. Delgadillo-Sánchez (2001). Calidad y Tolerancia en frutos de Papaya (*Carica papaya* L.) a la inoculación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., en postcosecha. Rev. Chapingo Serie Hort., 7(1):119-130.
- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel y A. Pereira (2004). The *SHINE* clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. Plant Cell, 16. 2463-2480.
- Báez, R., F. Tadeo, E. Primo-Millo y L. Zacarias (1993). Physiological and ultrastructural changes during the ripening and senescence of clementine mandarin. Acta Hort. 343:18-24.
- Bargel, H., K. Koch, Z. Cerman y C. Neinhuis (2006). Structure-function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes a smart material?. Funct. Plant Biol., 33: 893-910.
- Barnes, J.D., K.E. Percy, N.D. Paul, P. Jones, C.K. McLaughlin, P.M. Mullineaux, G. Creissen y A.R. Wellburn (1996). The influence of UV-B radiation on the physicochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surfaces. J. Exp. Bot. 47:99-109.
- Barthlott, W. y C. Neinhuis (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. Planta, 202(1):1-8.
- Barthlott, W., C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen y H. Wilhelm (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Bot. J. Linn. Soc., 126: 237-260.
- Bengston, C. S. Larsson y C. Liljenberg (1978). Effect of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. Plant Physiol., 44: 319-324.

- Bernard, A. y J. Joubès (2013). Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Prog. Lipid Res.*, 52: 110-129.
- Bondada, B.R., D.M. Oosterhuis, J.B. Murphy y K.S. Kim (1996). Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll, *Environ. Exp. Bot.*, **36**: 61-69.
- Bourdenx, B., A. Bernard, F. Domergue, S. Pascal, A. Léger, D. Roby, M. Prevente, D. Vile, R.P. Haslam, J.A. Napier, R. Lessiere y J. Joubè (2011). Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.*, **156**:29–45.
- Cameron, K.D, M.A. Teece y L.B. Smart (2006). Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.*, **140**:176-183.
- Carver, T.L. y S.J. Gurr (2006). Filamentous fungi on plant surfaces, in: *Biology of the Plant Cuticle*. M. Riederer y C. Müller (eds). Juliusvon-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp: 368-392.
- Chassot, C., C. Nawrath y J.P. Métraux (2008). The cuticle: Not only a barrier for plant defence. A novel defence syndrome in plants with cuticular defects. *Plant Signal. Behav.*, **3**:142-144.
- Domínguez, E., J.A. Heredia-Guerrero y A. Heredia (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol*, **189**:938-949.
- Domínguez, E., L. España, G. López-Casado, J. Cuartero y A. Heredia (2009). Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticles during ripening: the role of flavonoids. *Funct. Plant Biol.*, **36**:613-620.
- Engel, T. y W. Barthlott (1988) .“Micromophology of epicuticular waxes in Centrosperms”. *Plant Syst. Evol.*, **161**:71-85.
- Gamboa, L.R. (1996). Variación en la composición de ceras en diferentes ecotipos de *Cocos nucifera* L. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

- García, S., H. Heinzen, C. Hubbuch, R. Martínez, X. De Vries y P. Moyna (1995). Triterpene metil ethers from palmae epicuticular waxes. *Phytochemistry*, **39**:1381-1382.
- Goodwin, S.M. y M.A. Jenks (2005). Plant cuticle function as a barrier to water loss, in: P.M. Hasegawa, M.A. Jenks (Eds.), *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing, London. pp. 14-36.
- Hauke, V. y L. Schreiber (1998). Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Heredia helix* L.) sun and shade leaves. *Planta*, **207**:67-75.
- Isaacson, T., D.K. Kosma, A.J. Matas, G.J. Buda, Y. He, B. Yu, A. Pravitasari, J.D. Batteas, R.E. Stark, M.A. Jenks y J.K.C. Rose (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Planta*. **60**:363-377.
- Islam, M.A., H. Du, J. Ning, H. Ye y L. Xiong (2009). Characterization of Glossy1 homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance, *Plant Mol. Biol.*, **70**: 443-456.
- Jefferson, P.G., D.A. Johanson, M.D. Runbaugh y K.H. Asay (1989). Water stress an genotypic effects on epicuticular wax production of alfalfa and crested wheat grass in relation to yield and excised leaf water loss rate, *Can. J. Plant Sci.*, **69**:481-490.
- Jeffree, C.E. (2006). The fine structure of the plant cuticle, in: *Biology of the Plant Cuticle*. Riederer, M y C. Müller (eds). Julius-vonSachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg. Germany. pp.11-110.
- Jenks, M.A., L. Andersen, R.S. Teusink y M.H. Williams (2001). Leaf cuticular waxes of potted rose cultivars as affected by plant development, drought and paclo- butrazol treatments. *Plant. Physiol.*, **112**: 62-70.
- Jenks, M.A., R.J. Joly, P.J. Peters, P.J. Rich, J.D. Axtell y E.N. Ashworth (1994). Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal. *Plant Physiol.*, **105**: 1239-1245.

- Jenks, M.A., S.D. Eigenbrode y B. Lemieux (2002) Cuticular waxes of Arabidopsis. En: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Jetter, R. y S. Schäffer (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface: dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiol.*, **126**:1725–1737.
- Jetter, R., L. Kunst y L. Samuels (2006). Composition of plant cuticular waxes, in: *Biology of the Plant Cuticle*. M. Riederer y C Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:145-175.
- Jetter, R., S. Schäffer y M. Riederer (2000). Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell Environ.*, **23**:619-628.
- Jordan, W.R., P.J. Shouse, A. Blum, F.R. Miller y R.L. Monk (1984). Environmental physiology of sorghum. II. Epicuticular wax load and cuticular transpiration, *Crop Sci.*, **24**: 168-173.
- Kerstiens, G. (1996). Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure–function relationships. *Trends Plant Sci.*, **1**:125–129.
- Kerstiens, G. (2006). Water transport in plant cuticles: an update. *J. Exp. Bot.*, **57**:2493-2499.
- Khuzhaev, V.U. y S.F. Aripova (2000). Pseudocarpaine from *Carica papaya*. *Chem. Nat. Comp.*, **36**, 418-420.
- Knoche, M., M. Beyer, S. Peschel, B. Oparlakov y M. Bukovac (2004). Changes in strain and deposition of cuticle in developing sweet Cherry fruit. *Plant Physiol.*, **120**:667-677.
- Kosma, D.K., B. Bourdenx, A. Bernard, E.P. Parsons, S. Lü y J. Joubès (2009). The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **151**:1918–29.

- Kunst, L. y A.L. Samuels (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.*, **42**:51-80.
- Kuo, J. (2008). *Electron Microscopy, Conventional specimen preparation techniques for scanning electron microscopy of biological specimens*. Ed. Humana Press.
- Lallana M, C E Billard, J H Elizalde, V H Lallana (2006) Breve revisión sobre características de la cutícula vegetal y penetración de herbicidas. *Cien. Doc. Tecnol.* **17**: 229-241.
- Leide, J., U. Hildebrandt, G. Vogg y M. Riederer (2011). The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *Plant Physiol.*, **168**:871-877.
- Leide, J., U. Hildebrandt, K. Reussing, M. Riederer y G. Vogg (2007). The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a β -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiol.*, **144**:1667-1679.
- Letchamo, W. y A. Gosselin (1996). Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply, *J. Hortic. Sci.*, **71**: 123-134.
- Li, F., X. Wu, P. Lam, D. Bird, H. Zheng y L. Samuels (2008). Identification of the wax ester synthase/acyl-CoenzymeA: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **148**:97-107.
- López-Casado, A., J. Matas, E. Domínguez, J. Cuartero y A. Heredia (2007). Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *J. Exp. Bot.*, **58**: 3875-3883.
- Matas, A., J. Cuartero y A. Heredia (2004). Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticle. *Thermochim Acta*, **409**:165-169.
- Miean, K.H. y S. Mohamed (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 3106-3112.

- Olafsdottir, E.S., L.B. Jorgensen, y J.W. Jaroszewski (2002). Cyanogenesis in glucosinolate-producing plants: *Carica papaya* and *Carica quercifolia*. *Phytochemistry*, **60**:269–27.
- Panikashvili, D., S. Savaldi-Goldstein, T. Mandel, T. Yifhar, R.B. Franke, R. Hofer, L. Schreiber, J. Chory y A. Aharoni (2007). The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 Transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.*, **145**:1345-1360.
- Pares, J., M. Arizaleta, M.E. Sanabria y G. García (2008). Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, Índice estomático y el grosor foliar en plantas de *Carica papaya* L. *Acta. Bot. Venez.*, **31**(1):27-34.
- Parsons, E.P., S. Popopvsky, G.T. Lohrey, S. Lu, S. Alkalai-Tuvia, Y. Perzelan, I. Paran, E Fallik, y M.A. Jenks (2012). Fruit cuticle lipid composition and fruit post-harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (*Capsicum* sp.). *Plant Physiol.*, **146**:15-25.
- Petit, J.D., L.A. González, M.R. Sotelo y S.R. Báez (2007). Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica* L. *Rev. Fitotec. Mex.*, **30**:51-60.
- Premachandra, G.S., H. Saneoka, M. Kanaya y S. Ogata (1991). Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficits in maize. *J. Exp. Bot.*, **42**: 167–171.
- Rashotte, A., M. Jenks, T. Nguyen y K. Feldmann (1997). Epicuticular wax variation in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **45**(2): 251-255.
- Reicosky, D.A. y J.W. Hanover (1978). Physiological Effects of Surface Waxes. *Plant Physiol.*, **62**:101-104.
- Reina-Pinto, J.J. y A. Yephremov (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.*, **47**:540-549.
- Sardans, J., J. Peñuelas, P. Prieto y M. Estiarte (2008). Drought and warming induced changes in P and K concentration and accumulation in plant biomass and soil in a Mediterranean shrubland. *Plant Soil*, **306**: 261–271

- Nguyen, H. (1999). Molecular dissection of drought resistance in crop plants: from traits to genes. En Ribaut, J.M. y D. Poland (eds.). Molecular approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environments. CIMMYT, Mexico D.F. p. 36-40.
- Riederer, M. (2006). Introduction: biology of the plant cuticle, in: Biology of the Plant Cuticle. M Riederer, C Müller (eds). Julius-vonSachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg) Germany. pp: 1-8.
- Riederer, M. y L. Schreiber (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. J. Exp. Bot., **52**:2023-2032.
- Rogiers, S., J. Hatfield, V. Gunta, R. White y M. Keller (2004). Grape berry cv. Shiraz epicuticular wax and transpiration during ripening and preharvest weight loss. Amer. J. Enol. Vitic., **55**:121127.
- Samdur, S.M., P. Manivel, V.K. Jain, B.M. Chikani, H.K. Gor, S. Desai y J.B. Misra (2003). Genotypic differences and water-deficit induced enhancement in epicuticular wax load in peanut, Crop Sci., **43**: 1294-1299.
- Samuels, L., L. Kunst y R. Jetter (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. Annu. Rev. Plant. Biol., **59**:683–707.
- Sánchez, F.J., M. Manzanares, E.F. de Andrés, J.L. Tenorio y L. Ayerbe (2001). Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. Eur. J. Agron., **15**: 57-70.
- Sandford, D. y Satish, K. (1998). Neonato *Plutella xylostella* responses to surface wax components of a resistant cabbage. J. Chem. Ecol., **24**: 1611-1627.
- Schreiber, L. (2005) Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. Ann. Bot., **95**:1069-1073.
- Seo, P.J., S.B. Lee, M.C. Suh, M-J. Park, Y.S. Go y C-M. Park (2011). The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in Arabidopsis. Plant Cell, **23**:1138–52.

- Serralta, G.A, D. Zizumbo, D. Escalante y L.M. Peña (2012) Cuticular Wax Composition of Coconut Palms and their Susceptibility to Lethal Yellowing Disease. *J. Mex. Chem. Soc.*, **56**(1): 67-71.
- Serralta, G.A. (2000). Análisis y cuantificación de ceras epicuticulares presentes en hojas de diferentes ecotipos de *Cocos nucifera* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. 36 p.
- Sheperd, T. y W. Griffiths (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, **171**: 469–499
- Stark, R. y S. Tian (2006). The cutin biopolymer matrix, in: *Biology of the Plant Cuticle*. M. Riederer y C. Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp: 126-141.
- Stiles W. (1994) *Principles of plant physiology*. Discovery Publishing House
- Suh, M.C., A.L. Samuels, R. Jetter, L. Kunst, M. Pollard y J. Ohlrogge (2005) Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiol.*, **139**:1649–65.
- Svenningsson, M. (1988). Epi- and intracuticular lipids and cuticular transpiration rates of primary leaves of eight barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Physiol. Plant.*, **73**: 512–517.
- Tafolla, A., J.C. González, L.A. Tiznado, H.M. Zacarías y S.M. Báez (2013). Composition, physiology and biosynthesis of plant cuticle. *Rev. Fitotec. Mex.*, **36**(1): 3-12.
- Taiz, L. y E. Zeiger (2006). *Plant Physiol.*, Sinauer Associates, Inc. Four Edition. pp.670-705.
- Tanaka, H., M. Watanabe, D. Watanabe, T. Tanaka, C. Machida y Y. Machida (2002). ACR4, a putative receptor kinase gene of *Arabidopsis thaliana*, that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis. *Plant Cell Physiol.*, **43**:419–28.

- Teixeira, J.A, Z. Rashid, D. Tan Nhut, D. Sivakumar, A. Gera, S.M. Teixeira y P.F. Tennant (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. Tree For. Sci. Biotech., **1**(1): 47-73.
- Verardo, G., E. Pagani, P. Geatti, y P. Martinuzzi (2003). A thorough study of the surface wax of apple fruits. Analyt. Bioanal. Chem., **376**: 659-667.
- Vogg, G., S. Fischer, J. Leide, E. Emmanuel, R. Jetter, A. Levy y M. Riederer (2004). Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. J. Exp. Bot., **55**:1401-1410.
- Xu, H., L. Gauthier y A. Gosselin (1995). Stomatal and cuticular transpiration of greenhouse tomato plants in response to high solution electrical conductivity and low soil water content. J. Am. Soc. Hort. Sci., **120**: 417-422.
- Yang, J., M.I. Ordiz, G. Jan y R. Beachy (2011). Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata. Plant Physiol. Biochem., **49**: 1448-1455.
- Yeats, T.H., G.J. Buda, Z. Wang, N. Chehanovsky, L.C. Moyle, R. Jetter, A.A. Schaffer y J.K.C. Rose (2012). The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. Plant J. **69**:655-666.
- Yeats, T.H., K.J. Howe, A.J. Matas, G.J. Buda, T.W. Thannhauser y J.K.C. Rose (2010). Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. J. Exp. Bot., **61**:3759-3771.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES *CpShine* y *CpLac* EN *Carica papaya* L. MARADOL Y SILVESTRE EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO

V.1. INTRODUCCIÓN

La colonización de ambientes terrestres por parte de las plantas acuáticas ocurrió aproximadamente hace 450 millones de años atrás. Esto representó numerosos retos para la supervivencia de las plantas en estos ambientes, incluidos: la desecación, un aumento en los cambios de temperatura y una radiación UV (Bargel *et al.*, 2006; McCourt *et al.*, 2004). Para afrontar estas nuevas dificultades, las plantas terrestres desarrollaron una capa lipolítica que cubre a todos los órganos aéreos de la planta (Hen-Avivi *et al.*, 2014).

Esta capa lipolítica, mejor conocida como membrana cuticular o cutícula, es considerada el principal elemento en la colonización de los ambientes terrestres. En contraste a otras capas celulares, la epidermis desarrolla una única pared celular que no sólo está compuesta de celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas, sino también por una matriz cuticular, que está conformada por la cutina embebida, mezclada con ceras y otras sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, los cuales constituyen la capa cuticular (Kunst y Samuels, 2003; Jetter *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2011; Taiz y Zeiguer, 2002). La cutina, es un polímero insoluble cuticular compuesto en su mayoría por ácidos grasos de cadena media (Panikashvili *et al.*, 2007; Suh *et al.*, 2005; Kolattukudy, 2001; Lee *et al.*, 1999). Conforme las células de la epidermis crecen, la cutícula emerge gradualmente junto con los componentes de la pared celular (Jeffre, 1996). A la fecha no se tiene un consenso sobre el rol de la cutícula en la regulación del crecimiento de los órganos, sin embargo, está claro que ésta capa es vital para la supervivencia, desarrollo e interacción de la planta con el medio ambiente (Reina-Pinto *et al.*, 2009; Bach y Faure, 2010; Kutschera, 2007; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007).

La cutina y las ceras son sintetizadas exclusivamente en la epidermis (Nawrath, 2002), el flujo de los lípidos ocurre desde los sitios donde se lleva a cabo la síntesis de los lípidos en los plástidos y en el retículo endoplasmático (ER), a la superficie de la planta durante

la deposición de la cutícula (Suh *et al.*, 2005). A pesar del progreso significativo que se ha hecho en la identificación de los genes involucrados en la biosíntesis y secreción de los lípidos en la cutícula, en el metabolismo y ensamblaje de los componentes primarios de la pared celular aún se desconoce los genes específicos involucrados en cada etapa de la biosíntesis (Pollard *et al.*, 2008; Samuels *et al.*, 2008).

V.1.1. Biosíntesis de ceras

A la fecha se tienen muchos estudios descriptivos y comparativos sobre la composición y ultra estructura de la cutícula, pero poco se ha comprendido acerca de la biosíntesis, transporte y ensamblaje de los compuestos que conforman la cutícula (Yeats *et al.*, 2010; Isaacson *et al.*, 2009; DeBono *et al.*, 2009). En las plantas, las células epidérmicas emplean gran cantidad de energía para producir cutícula, por ello la síntesis de cera requiere la coordinación de actividades de numerosas enzimas organizadas en complejos multienzimáticos en varios organelos celulares (cloroplastos, citoplasma y retículo endoplasmático), donde se lleva a cabo la síntesis y elongación de los ácidos grasos, precursores de las ceras y la formación de una multitud de compuestos alifáticos (Kunst *et al.*, 2006; Kunst y Samuels, 2003).

Los compuestos alifáticos de las ceras cuticulares consisten de una mezcla de varias moléculas de cadena larga de carbono que van de los 22 a 26 carbonos. Son producidos por el complejo de elongación de ácidos grasos (FAE), que pueden ser transformados en VLCFAs (very long chain fatty acids) libres o procesados dentro de dos rutas: (i) la ruta formadora de alcoholes o (ii) la ruta formadora de alcanos que da lugar a la producción de todos los compuestos presentes en las ceras (Figura V.1). La ruta formadora de alcoholes produce números pares de compuestos que representan cerca del 17-18% del total de ceras. Mientras que los alcoholes primarios son predominantemente cadenas de 26 a 30 carbonos de largo, solamente corresponden al 12-14% de las ceras totales. Paralelamente en la ruta formadora de alcoholes, la biosíntesis de las ceras produce aldehídos y alcanos con cadenas impares, alcoholes secundarios y cetonas con cadenas predominantemente de 27-33 carbonos (Tafolla *et al.*, 2013; Kunst y Samuels, 2013). En *Arabidopsis thaliana*, cerca del 80% de la cantidad total de ceras presentes está constituido de alcanos como su central y principal componente.

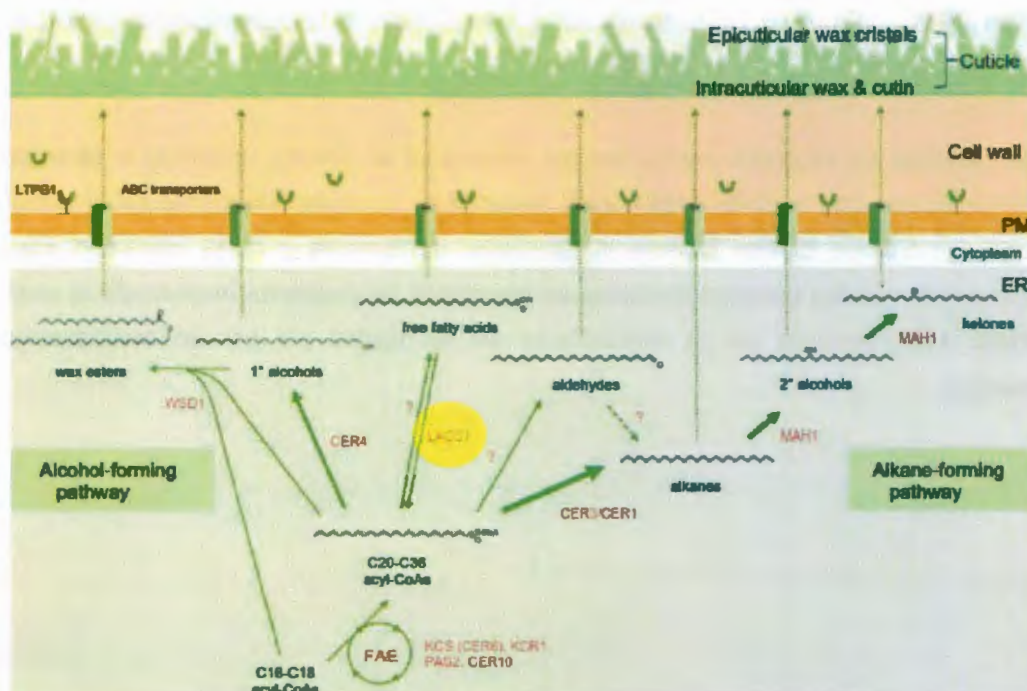


Figura V.1. Ruta de biosíntesis de ceras. Se distinguen tres etapas: síntesis de *novo* de ácidos grasos, elongación de los ácidos grasos (FAE) y transporte de monómeros hacia el exterior de la pared celular. Se señala la ubicación de los genes *LACS* dentro de la ruta de biosíntesis de ceras (Tafolla *et al.*, 2013).

V.1.2. Genes involucrados en la biosíntesis de ceras cuticulares

La ruta de biosíntesis de los componentes que conforman la cutícula y su secreción a la matriz extracelular está involucrada en una ruta metabólica de varios pasos, en el cual los factores de transcripción juegan un rol fundamental (Broun *et al.*, 2004; Pollard *et al.*, 2008). El Factor de Transcripción *SHINE1/WAX INDUCER1 (SHN1/WIN1)*, fue el primer FT reportado en el control metabólico de las rutas que generan las ceras cuticulares (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). Un estudio subsecuente indicó que *SHN1/WIN1* controla la permeabilidad de la cutícula, regulando la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de la cutina, particularmente de los genes *LACS2* (LONG CHAIN ACYL-CoA SYNTHETASE 2). Se ha sugerido que la inducción en la formación de ceras en las hojas por la sobre expresión de los genes *SHINE*, se debe a un paso secundario,

posiblemente un proceso indirecto seguido a la biosíntesis de la cutina (Kannangara *et al.*, 2007).

Los patrones de expresión evaluados por Aharoni *et al.* (2004), utilizando el promotor *GUS* indicaron que el clado *SHINE* está presente en la capas protectoras de la planta, como las que se forman durante la abscisión, dehiscencia y daño mecánico. Ellos propusieron que las diversas funciones en las cuales se encuentra involucrado el clado *SHINE* son regulados por el metabolismo de los lípidos y/o por los componentes celulares.

V.2. OBJETIVOS

V.2.1. Objetivo General

- Evaluar los cambios en los patrones de expresión de genes de la familia *CpShine* y genes tipo *CpLac* en plantas de *Carica papaya* L. de un genotipo susceptible (Maradol) y uno tolerante (Silvestre) expuestas a diferentes tratamientos de déficit hídrico.

V.2.2. Objetivo Particular

- Analizar la expresión basal de los genes *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3* en diferentes tejidos en plantas adultas de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre.
- Comparar los patrones de expresión de los genes de interés en los diferentes tejidos de ambos genotipos expuestos a condiciones de estrés por déficit hídrico.

V.3. HIPOTESIS

Los genes tipo *SHINE* y *LAC* de *Arabidopsis thaliana* presentan diferentes patrones de expresión en diferentes tejidos; por lo tanto, es probable que genes homólogos *SHINE* y *LAC* en *Carica papaya* L. también presenten cambios en los patrones de expresión en respuesta a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico.

V.4. MATERIALES Y MÉTODOS

V.4.1. Material Vegetal

V.4.1.1 Colecta de tejido vegetal adulto

Para el estudio de la expresión basal de los genes *CpShine* y *CpLac* en plantas adultas (1 año de edad) de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre cultivadas en condiciones de riego constante, se colectó material vegetal de la plantación experimental ubicada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY). Para ambos genotipos los tejidos analizados fueron: Raíz, Tallo, Hoja, Flor y Cáscara de fruto inmaduro, mismos que fueron colocados en N₂ líquido durante su traslado al Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular y se resguardaron a -80 °C hasta su procesamiento.

V.4.1.2 Colecta de tejido vegetal joven

Para la colecta del material joven se inició con el tratamiento pre-germinativo de las semillas colectadas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre (Cap. III) en bolsas para cultivo (17 x 17 cm) utilizando una mezcla tierra: sustrato (3:1), las semillas se colocaron a 1 cm de profundidad. Las plantas fueron ubicadas dentro del invernadero 1 del CICY, protegidas con una malla antiáfidos y monitoreando las condiciones ambientales de HR, DFF y T° ambiente. Cuando las plantas alcanzaron una edad de 70 d y una altura aproximada de 24 cm, fueron transferidas y aclimatadas durante 2 d en un cuarto de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular en condiciones de fotoperiodo de 12 h, DFFF de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ día/noche y 25 °C $\pm$ 1 °C, para la experimentación. El riego consistió de 50 mL de agua cada segundo día durante los primeros 30 d, mientras que el tiempo restante, el riego fue de 100 mL cada segundo día. Se aplicó una solución nutritiva comercial (Bayfolan® líquido, Bayer) (1 mL L⁻¹) dos veces por semana, también se mantuvo un programa contra plagas.

Las colectas del material vegetal se llevaron a cabo tomando las hojas completamente expandidas situadas en el estrato medio de la planta. Para el caso del tallo, se colectó desde la base del tallo hasta la mitad de la planta. Finalmente para la raíz se tomó todo el tejido y se retiró el sustrato adherido con agua destilada. Todos los tejidos fueron

colectados de manera separada en bolsas de aluminio previamente rotuladas. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

V.4.1.3. Grupos de tratamientos sometidos a estrés por déficit hídrico.

En base a los resultados obtenidos del análisis fisiológico realizado a plantas jóvenes de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a estrés por déficit hídrico (Capítulo III), se seleccionaron los tiempos de estrés hídrico a analizar y se montó un segundo experimento siguiendo las mismas condiciones de riego para evaluar cambios en la expresión de los genes *CpShine* y *CpLac* bajo diferentes periodos de déficit hídrico y de recuperación. Los individuos muestreados estuvieron bajo las mismas condiciones ambientales: HR, DFF y T° ambiente; variando únicamente los días de riego.

La Figura V.2 presenta la distribución de los grupos analizados en los días que duró el experimento y se señalan los tiempos en que se colectaron las muestras para cada uno de los tratamientos. En éste esquema se distinguen 3 grupos, la frecuencia de riego para cada uno de los grupos fue la siguiente:

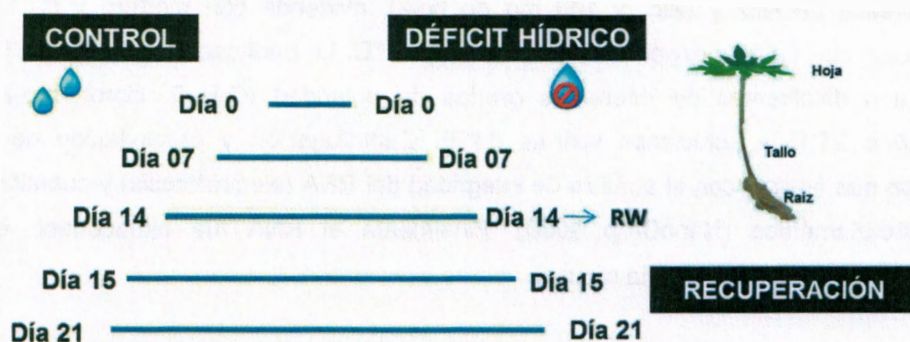


Figura V.2. Distribución de los grupos de plantas analizadas. Los recuadros indican el tipo de grupo a que corresponde y los tejidos muestreados. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 14.

Grupo Control. El riego se mantuvo sin cambios a lo largo del experimento y consistió en la aplicación de 100 mL de agua cada segundo día. Se tomaron muestras al tiempo 0, 7, 14, 15 y 21 días, donde se obtuvo tejido para comparar los patrones de expresión con los obtenidos en las plantas del grupo de Déficit Hídrico y Recuperación.

Grupo Déficit Hídrico. El riego se suspendió en diferentes tiempos, en este grupo se trabajó con 3 lotes, que corresponden a las plantas con déficit hídrico por 7, 14 y 21 días.

Grupo Recuperación. Finalmente, para evaluar la capacidad de recuperación de las plantas ante un déficit hídrico y los posibles cambios en los patrones de expresión de los genes *CpShine* se trabajó con un grupo de recuperación en el que el riego se reestableció a partir del día 14 después de iniciado el tratamiento por déficit hídrico. Se tomaron muestras al día 15 y 21 de iniciado el experimento (Figura V.1).

Cada grupo consistió de 5 plantas jóvenes y al finalizar cada tratamiento (control, déficit hídrico y recuperación), se colectaron por separado muestras de tejido: raíz, tallo y hoja, mismos que fueron almacenados en -80 °C hasta su análisis molecular.

V.4.2. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el protocolo previamente establecido en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular de la Unidad de Biotecnología (Uh, 2008 con modificaciones) que de forma general comprende el pesaje de la muestra (200 mg de peso fresco de raíz y tallo, y 100 mg de hoja), molienda con mortero y N₂ líquido, extracción con CTAB previamente calentado a 60 °C. La purificación del RNA se lleva a cabo con disolventes de diferentes grados de polaridad (C₂H₆O, cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y soluciones salinas (LiCl). Centrifugación y precipitación de RNA, proceso que finaliza con el análisis de integridad del RNA (electroforesis) y cuantificación espectrofotométrica (NanoDrop 1000). Finalmente el RNA fue almacenado en un ultracongelador a -80 °C hasta su uso.

V.4.3. Síntesis de cDNA

En tubos Eppendorf de 20 µL se agregó el volumen necesario de RNA para obtener una concentración de 500 ng de RNA en 9 µL de muestra. Se adicionaron Random Primers a una concentración 1 µg/L, posteriormente se incubó a 70 °C durante 5 min e inmediatamente las muestras fueron colocadas en hielo durante 30 s. Se añadieron 9 µL de la mezcla de reacción compuesta por 4.0 µL de Buffer 5x First Standard, 2.0 µL DTT (0.1 M), 1.0 µL MgCl₂ (25 mM), 1.0 µL de Mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 1.0 µL transcriptasa reversa (Invitrogen). Los tubos fueron agitados suavemente y centrifugados durante 10 s. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 5 min, 42 °C por 90 min y

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

V.4.4. Análisis de RT-PCR

La extensión de los genes *CpShine 1* y *2*; y *CpLac 2* y *3* se efectuaron a partir de 1.5 a 2 µL de template en mezcla con 5 µL de Buffer 10x PCR, 2.0 µL MgCl₂ (50 mM), 0.8 µL de dNTPs, 1µL de oligonucleótido Sentido, 1 µL de oligonucleótido Antisentido, 0.2 µL de Taq Polimerasa (Invitrogen), y agua grado molecular suficiente para aforar a un volumen de 50 µL. Las condiciones de PCR, en general, utilizadas fueron las siguientes: 95 °C durante 3 min para la desnaturalización inicial, seguido de 29 ciclos con desnaturalización a 95 °C durante 30 s, la alineación a 55.6 °C durante 1 min, la extensión a 72 °C durante 2 min, y la etapa de extensión final a 72 °C durante 5 min. Se separaron los fragmentos en gel de agarosa al 1.5% a 75 V durante 55 min. Adicionalmente, se utilizó como control los oligonucleótidos diseñados para *Carica papaya* L. de un gen marcador constitutivo (*CpEF1α*).

V.4.5. Electroforesis de RNA

Preparación del gel: se pesaron y colocaron 1.35 g de agarosa (1.5%) en un matraz Erlenmeyer (250 mL), posteriormente se añadió 90 mL de buffer de electroforesis (TAE 1X), seguidamente, la agarosa con el TAE fueron expuestos a calor para la disolución del gelificante, posteriormente se vertió la agarosa en la bandeja de la cámara de electroforesis y se agregaron 2 µl de Bromuro de Etidio (EtBr). Se dejó solidificar la agarosa con los respectivos peines y finalmente se añadió el buffer de electroforesis hasta el borde del gel. Las condiciones de corrida para los geles analizados fueron: 75 V, 55 min y 400 mA.

V.5. RESULTADOS

V.5.1. Análisis de calidad de RNA

Las lecturas correspondientes a la cuantificación del RNA extraído en: Raíz, Tallo, Hoja, Flor y Cáscara de fruto inmaduro de plantas adultas de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre, utilizadas para el análisis de la expresión basal de los genes *CpShine* y *CpLac*, se encuentran detalladas en el Cuadro V.1. Por otra parte, las lecturas de la cuantificación del RNA extraído en los tejidos: Raíz, Tallo y Hoja de plantas jóvenes de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre utilizadas en los diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (control, día 7, día 14, día 15 y día 21) se encuentran enlistadas en los Cuadros V.2 y V.3 respectivamente. Posterior a la cuantificación del RNA, se realizó un gel de agarosa 1.5% para visualizar las dos bandas ribosomales características del RNA (Figura V.2).

Cuadro V.1. Cuantificación del RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído en diferentes tejidos de plantas adultas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre cultivadas en condiciones de riego constante.

Tejido	Tratamiento	Peso muestra (g)	A260/ 280	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Rendimiento $\mu\text{gRNA/gPF}$
Raíz	Maradol	0.17	2.11	161.40	28.65
Tallo		0.16	2.00	142.10	27.34
Hoja		0.06	2.09	577.90	273.02
Flor		0.19	2.09	302.20	47.02
Fruto		0.22	2.10	232.10	31.56
Raíz	Silvestre	0.20	2.13	159.50	23.61
Tallo		0.19	2.03	293.80	46.32
Hoja		0.05	2.09	498.70	290.50
Flor		0.20	2.04	289.60	43.44
Fruto		0.20	2.12	953.40	144.31

A partir de la extracción de RNA en plantas adultas de dos genotipos de *C. papaya* Maradol y Silvestre, se observa que el rendimiento de RNA en ambos fue mayor en hoja con valores de 273.02 y 290 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ respectivamente, por el contrario, los rendimientos más bajos se obtuvieron en tallo y raíz, con 27.34 y 28.65 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ en Maradol y con 46.32 y 23.61 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ para Silvestre.

Cuadro V.2. Cuantificación del RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído en diferentes tejidos de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico.

Tejido	Tratamiento	Peso muestra (g)	A260/ 280	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Rendimiento $\mu\text{gRNA/gPF}$
Raíz	Día 0	0.23	1.90	721.37	94.1
Tallo		0.26	2.01	305.95	35.6
Hoja		0.10	1.99	879.75	261.6
Raíz	Día 07	0.19	2.07	190.10	30.0
Tallo		0.22	2.08	206.40	28.0
Hoja		0.11	1.96	805.70	220.5
Raíz	Día 14	0.22	1.95	627.89	84.9
Tallo		0.17	1.91	233.73	41.3
Hoja		0.10	1.95	605.40	175.8
Rw Raíz	Día 15	0.21	2.05	530.50	75.1
Tallo		0.19	2.08	165.20	25.5
Hoja		0.12	2.07	530.50	138.3
Raíz	Día 21	0.20	1.92	541.80	82.8
Tallo		0.21	1.90	273.12	39.9
Hoja		0.13	2.00	2186.40	486.9

Cuadro V.3. Cuantificación del RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído en diferentes tejidos de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico.

Tejido	Tratamiento	Peso muestra (g)	A260/ 280	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Rendimiento $\mu\text{gRNA/gPF}$
Raíz	Día 0	0.19	1.90	507.13	79.53
Tallo		0.21	1.94	607.57	86.80
Hoja		0.14	1.97	1866.40	399.94
Raíz	Día 07	0.21	2.09	384.00	55.52
Tallo		0.29	2.09	237.70	24.62
Hoja		0.11	2.13	1522.40	406.70
Raíz	Día 14	0.20	1.93	225.08	33.61
Tallo		0.26	1.98	167.27	19.15
Hoja		0.15	2.01	988.22	192.04
Rw Raíz	Día 15	0.23	2.05	530.50	70.70
Tallo		0.22	2.08	165.20	22.27
Hoja		0.11	2.07	530.50	143.38
Raíz	Día 21	0.20	1.98	543.00	81.45
Tallo		0.21	1.95	441.15	63.02
Hoja		0.10	1.93	738.70	216.63

En el Cuadro V.2 se observa que el rendimiento de RNA por g de Peso Fresco fue mayor en hoja para todos los tiempos con valores promedio de $247.6 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$, en raíz fue de $73.4 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ y los más bajos en tallo con $34.1 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$. Para el caso del genotipo Silvestre (Cuadro V.3) también se obtuvo mayor rendimiento de RNA en el tejido de hoja en todos los tiempos analizados con $216 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ en promedio, mientras que valores intermedios de $81.45 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ fueron obtenidos en raíz y los más bajos en tallo con $63.02 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$. En ambos genotipos, se observó que el rendimiento de RNA en hoja disminuyó conforme aumentaron los días de exposición al estrés, por ejemplo, entre los días 0 y 14, el rendimiento en Maradol pasó de 261.6 a $175.8 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ y en Silvestre de 399.94 a $192.01 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$.

Los valores obtenidos de la cuantificación de RNA en tejido de plantas jóvenes y adultas de *C. papaya* L. de ambos genotipos fueron adecuados para continuar con la evaluación de los cambios en la expresión de los genes *CpShine* y *CpLac*, ya que además de presentar un alto rendimiento en hoja ($> 100 \mu\text{g RNA gPF}^{-1}$) tienen un grado de pureza (A_{260}/A_{280}) dentro de los parámetros aceptados (1.8-2.0). Un alto grado de pureza es fundamental para evitar que la contaminación de la muestra con impurezas orgánicas e inorgánicas afecte la sensibilidad y especificidad del resultado. Para observar la integridad del RNA obtenido se procedió a analizar las unidades ribosomales 28 y 18S. En la Figura V.3 se observa que las bandas obtenidas de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre, se encuentran íntegras y sin degradar, por lo que después del análisis de integridad del RNA se pasó a la prueba de los oligonucleótidos. El análisis de integridad de los tiempos faltantes de ambos genotipos se presenta en el Anexo V.1.

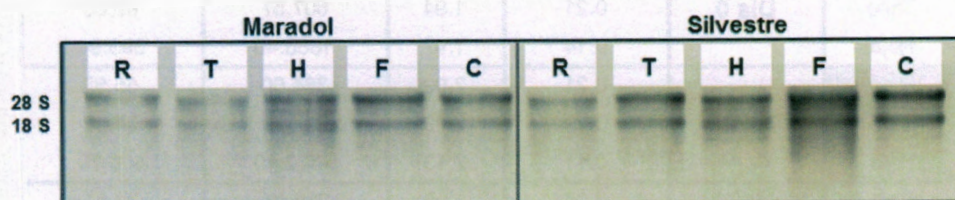


Figura V.3. Unidades ribosomales (28S y 18S) de RNA extraído de tejido vegetal (Raíz (R), Tallo (T), Hoja (H), Flor (F) y Cáscara (C)) de plantas adultas de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre. Electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 1.5%, teñido con bromuro de Etidio.

V.5.2. Prueba de Oligonucleótidos

Después de realizar la extracción y evaluar la cuantificación de RNA de las muestras, se procedió a probar los oligonucleótidos diseñados en el Capítulo II específicos para los genes *SHINE* y *LAC* en *Carica papaya*, siguiendo la metodología señalada en el apartado V.4.4. Adicionalmente, se trabajó con el gen marcador (*housekeeping*) *CpEF1α* diseñado específicamente para *C. papaya* L. en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular. El tamaño de la secuencia obtenida de los oligonucleótidos evaluados correspondientes a cada gen de interés y su T_m se presenta en el Cuadro V.3. El diseño de los oligonucleótidos produce una secuencia con un amplicón de 359 pb (*CpShine1*), 225 pb (*CpShine2*), 327 pb (*CpLac2*), 263 pb (*CpLac3*) y 200 pb (*CpEF1α*). En todos los oligonucleótidos se procuró que tuvieran una T_m entre 55 y 61 °C. Una temperatura de fusión (T_m) elevada ayuda a reducir la probabilidad de formar dímeros y se puede corroborar con un análisis por electroforesis para cada gen de interés.

Cuadro V.4. Tamaño esperado de amplicón (pb) y T_m (°C) para cada juego de oligonucleótido diseñado para los genes de interés de este estudio en *Carica papaya* L.

Oligonucleótido	Tamaño esperado del amplicón (pb)	T_m °C
<i>CpShine1</i>	359	59
<i>CpShine2</i>	225	59
<i>CpLac2</i>	327	55
<i>CpLac3</i>	263	55
<i>CpEF1α</i>	200	59

A continuación, se presenta el gel de agarosa al 1.5% donde se observa la migración del amplicón esperado para cada secuencia de interés (Figura V.3). En esta figura puede observarse que los 5 juegos de oligonucleótidos evaluados (*CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2*, *CpLac3* y *CpEF1α*) amplificaron una sola banda específica, tuvieron el tamaño de banda esperado (359, 225, 327, 263 y 200 bp respectivamente) y no forman dímeros que pudieran afectar la especificidad del resultado.

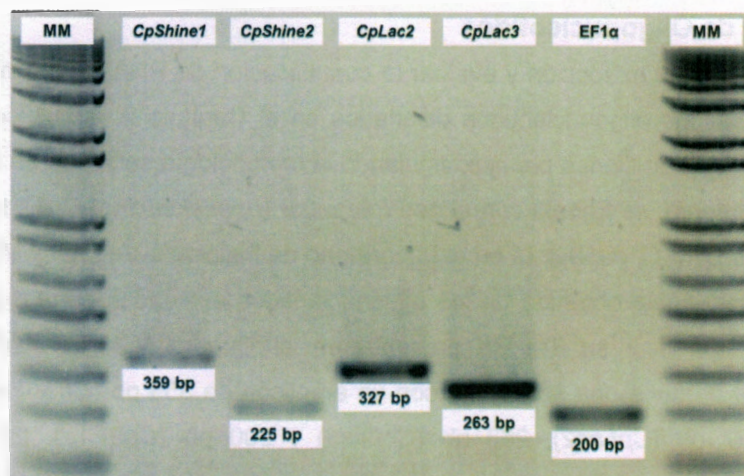


Figura V.4. Amplificación de 4 genes: *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2*, *CpLac3* en tejido (hoja) de planta control de *Carica papaya* L. Maradol. Debajo cada banda de amplificación se indica los pesos en bp. Se utilizó como control el gen constitutivo *CpEF1α*, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1Kb plus. Gel al 1.5 de Agarosa, teñido con Bromuro de Etidio.

Una vez corroborado que los juegos de oligonucleótidos amplificaron una sola banda específica con el tamaño esperado del amplicón, se prosiguió a realizar un análisis de RT-PCR de gradiente, de acuerdo a lo señalado en el apartado V.4.4. Esto con el objetivo de determinar la temperatura óptima a la que hay una mejor amplificación y utilizarla en los siguientes análisis de expresión de cada gen. Las temperaturas de amplificación evaluadas para cada juego de oligonucleótidos fueron: 53, 55, 57, 59 y 61 °C.

A partir de los productos obtenidos de la RT-PCR de gradiente, se realizó un gel de Agarosa al 1.5% en donde se observa que todos los juegos de oligonucleótidos amplifican en todas las temperaturas analizadas (53, 55, 57, 59 y 61 °C). Sin embargo, para observar claramente el efecto de los tratamientos de estrés por déficit hídrico y evitar errores en la interpretación de los patrones de expresión posteriores, se eligieron las temperaturas cuya banda amplificada fuera clara y no presentara arrastre de producto o formación de dímeros. En base a estos criterios, se observó que las bandas de amplificación fueron más nítidas a 59 °C para el caso de *CpShine1* y *CpShine2*, y 55 °C para *CpLac2* y *CpLac3*. Adicionalmente, estudios previos realizados en el Laboratorio de

Fisiología Molecular y Vegetal, han determinado que la mejor temperatura de amplificación para el gen marcador (*CpEF1α*) es de 59 °C (Figura V.5).

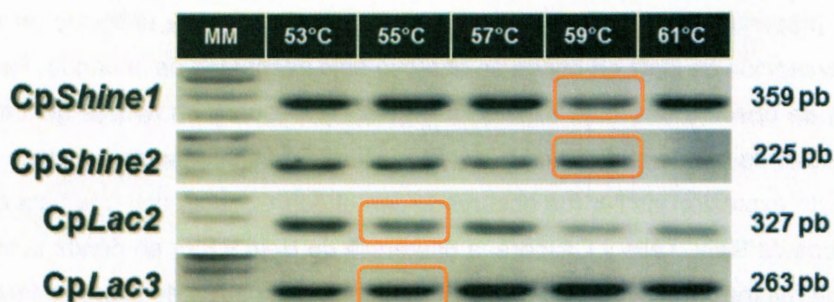


Figura V.5. Análisis por RT-PCR de gradiente de 4 genes: *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3* en tejido de Hoja de una planta adulta de *C. papaya* L. Maradol. En los recuadros del margen izquierdo se indica el nombre de cada gen y los del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. Los recuadros superiores indican las temperaturas analizadas para cada caso (de izquierda a derecha): 53, 55, 57, 59 y 61 °C. Se utilizó marcador de peso molecular (MM) de 1Kb. Gel al 1.5 de Agarosa, teñido con Bromuro de Etidio.

V.5.3. Expresión Basal de genes *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3* en plantas adultas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre.

Con el objetivo de evaluar la expresión basal de *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3*, en diferentes tejidos de plantas adultas (1 año de edad) de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, se colectaron diferentes tejidos (Raíz, Tallo, Hoja, Flor y Cáscara de fruto inmaduro) de la plantación experimental ubicada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) expuestas a condiciones de riego constante.

En la evaluación de la expresión basal, se observaron diferencias en la expresión de los cuatro genes de interés en los tejidos analizados de *C. papaya* L. genotipo Maradol y Silvestre (Figura V.6). En ambos genotipos, la expresión de *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3* fue detectada en todos los tejidos. La expresión de *CpShine1* fue baja en comparación con la expresión alta constitutiva de *CpLac3* en todos los tejidos. Por otra parte, la expresión de *CpShine2* y *CpLac2* fue detectada en todos los tejidos, sin

embargo, la intensidad de la banda fue mayor en los tejidos de Hoja y Flor de ambos genotipos y muy baja en la cáscara del fruto inmaduro.

CpShine1 presentó en ambos genotipos una intensidad de banda uniforme en todos los tejidos a excepción de Raíz en donde se observó baja intensidad de la banda. Para el gen *CpShine2*, se observó una baja expresión en Raíz y Cáscara en ambos genotipos; con una intensidad de banda mayor en Hoja y Flor, siendo más intensa en la planta Maradol. Un patrón de expresión similar fue observado con el gen *CpLac2*, con una baja expresión en los tejidos de Raíz, Tallo y Cáscara, a diferencia de Hoja y Flor en donde la intensidad de la banda fue mayor en ambos genotipos. Finalmente el patrón de expresión de *CpLac3* es alta constitutiva en todos los tejidos analizados de los dos genotipos.

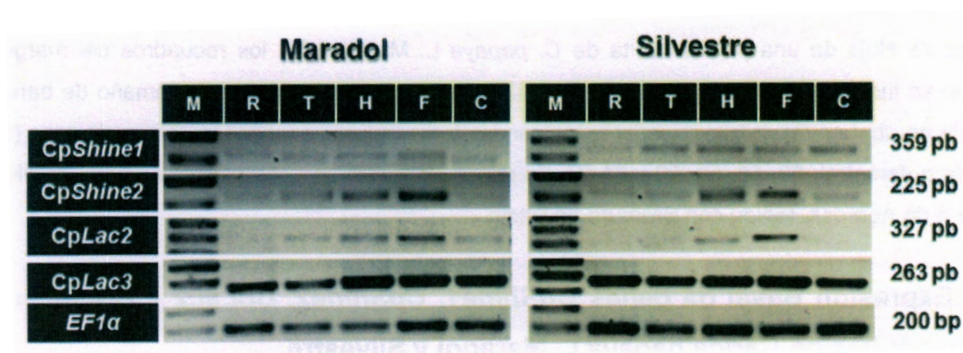


Figura V.6. Expresión basal de 4 genes en diferentes de plantas adultas (1 año de edad) de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a condiciones de riego constante. Los recuadros superiores indican el tejido analizado tejido (R: Raíz; T: Tallo; H: Hoja; F: Flor; y C: Cáscara fruto) Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue *CpEF1α*. El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.

Las diferencias observadas en los patrones de expresión basal de los tejidos analizados sugieren que los miembros del clado *SHINE* pueden desempeñar diferentes funciones, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés por déficit hídrico. Además, los cambios en los patrones de expresión varían de manera espacio temporal. Por su parte, la expresión basal de los genes del clado *LAC* señala la importancia de *CpLac2* en

los diferentes tejidos de la planta a diferencia de *CpLac3* cuya expresión en todos los tejidos fue alta constitutiva.

V.5.4. Expresión diferencial de *CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3*, en plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a un estrés por déficit hídrico

En el análisis molecular de las plantas jóvenes de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre, el grupo control fue el tiempo 0, los tiempos de exposición al estrés evaluados fueron: 7 y 14 d; finalmente, los tiempos de recuperación fueron: 15 y 21 d. Se detectó la expresión de los cuatro genes en todos los tratamientos, incluido el tiempo 0. A continuación, se presenta una descripción del patrón de expresión observado en cada uno de los tejidos evaluados que corresponden a: Raíz, Tallo y Hoja. (Figuras V.7 – V.9).

En la **Raíz** (Figura V.7) se observa que el gen *CpShine1* presenta un bajo patrón de expresión en el genotipo Maradol que se mantiene constante en todos los tiempos evaluados, por su parte en el genotipo Silvestre, se observa que el patrón de expresión aumenta con el tiempo de exposición con una mayor expresión al día 14 (tiempo máximo de estrés), misma que disminuye una vez que el riego es reincorporado al día 15 y se mantiene sin cambios hasta el final del experimento. En el caso del gen *CpShine2*, se obtuvo, para ambos genotipos, un bajo nivel de expresión que se mantuvo constante en todos los tiempos de exposición al déficit hídrico. El tercer gen evaluado, corresponde a *CpLac2*, cuyo patrón de expresión aumentó, en el genotipo Maradol, conforme incrementó el tiempo de exposición al estrés, observándose una mayor expresión en los tiempos de recuperación, al día 15 la intensidad de banda es mayor y a los 21 d se registra una baja expresión nuevamente. En el caso del genotipo Silvestre la expresión baja de *CpLac2* es constante en todos los tiempos de exposición, a excepción del día 14, en donde se observa una mayor expresión, que disminuye nuevamente cuando inicia el periodo de recuperación. Finalmente, la expresión del gen *CpLac3* en el genotipo Maradol aumentó con el tiempo de exposición, incluso durante el periodo de recuperación. Por el contrario, para el genotipo Silvestre la expresión de este gen parece ser altamente constitutiva, a excepción del día 7 en donde se observa una expresión intermedia. En base a los patrones de expresión obtenidos en el tejido de raíz en respuesta a un estrés por déficit hídrico se deduce la importancia de los genes *CpShine1* y *CpLac2*.



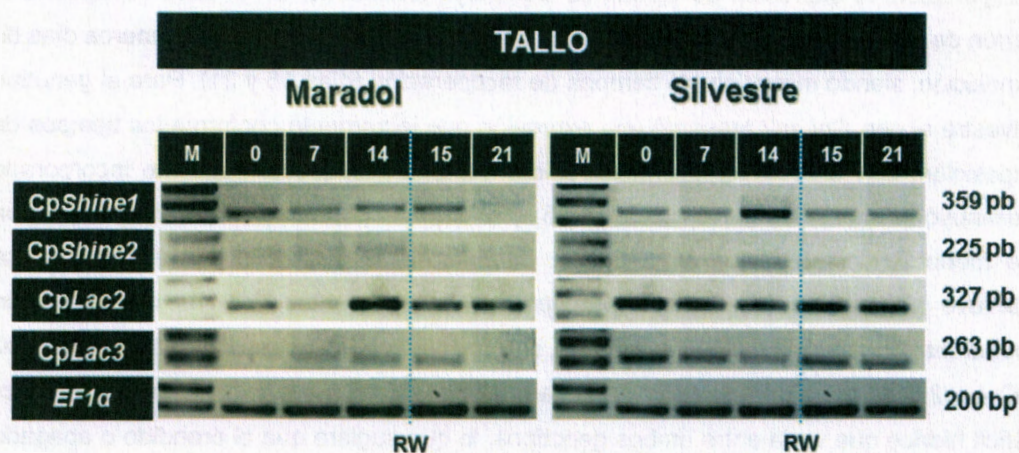


Figura V.8. Expresión de 4 genes en tallo de plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico (recuadros superiores) que fueron de: 0, 7 y 14 d y a dos periodos de recuperación: 1 d y 7 d. Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue *CpEF1α*. El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.

En **Hoja** (Figura V.9) la expresión del gen *CpShine1* en el genotipo Maradol es baja al día 0 e incrementa levemente conforme transcurre el tiempo de exposición, al tiempo 14 la intensidad de banda es mayor y al momento de reincorporar el riego se mantiene, no obstante al día 15 de recuperación, la expresión es similar a la del tiempo 0. De manera similar, en el genotipo Silvestre la expresión de *CpShine1* aumenta conforme transcurre el tiempo de exposición al estrés, diferenciándose en que la intensidad de banda al día 14 es mayor en comparación con Maradol. El patrón de expresión del gen *CpShine2* en Maradol aumentó conforme el tiempo de exposición al estrés, observándose una mayor intensidad en la banda al día 14, que disminuyó al aplicar el riego en los tiempos 15 y 21. Para el genotipo Silvestre se obtuvo un patrón de expresión similar, con una intensidad de banda mayor en comparación a Maradol, aunado a ello una vez iniciado el periodo de recuperación, la expresión de *CpShine2* disminuyó totalmente. En el caso de *CpLac2* el patrón de expresión en el genotipo Maradol se mantuvo constante en los primeros días de exposición, siendo mayor en los tiempos de recuperación (días 15 y 21). Para el genotipo Silvestre el gen *CpLac2* presentó una expresión que incrementó conforme los tiempos de exposición, con una mayor expresión al día 14, una vez que el riego fue incorporado disminuyó la intensidad de la banda (d 15) y al final del experimento (21 d) la expresión fue menor en comparación al tiempo 0. Finalmente, la expresión alta de *CpLac3* se mantuvo sin cambios en ambos genotipos en los diferentes tiempos de exposición evaluados. Del análisis molecular en Hoja, se observa que los genes *CpShine1*, *CpShine2* y *CpLac2* tiene un patrón de expresión diferencial en relación a la exposición al estrés por déficit hídrico que varía entre ambos genotipos, lo que sugiere que el prendido o apagado de estos genes puede estar relacionado a la respuesta a nivel molecular por parte de la planta Silvestre a tolerar el estrés impuesto.

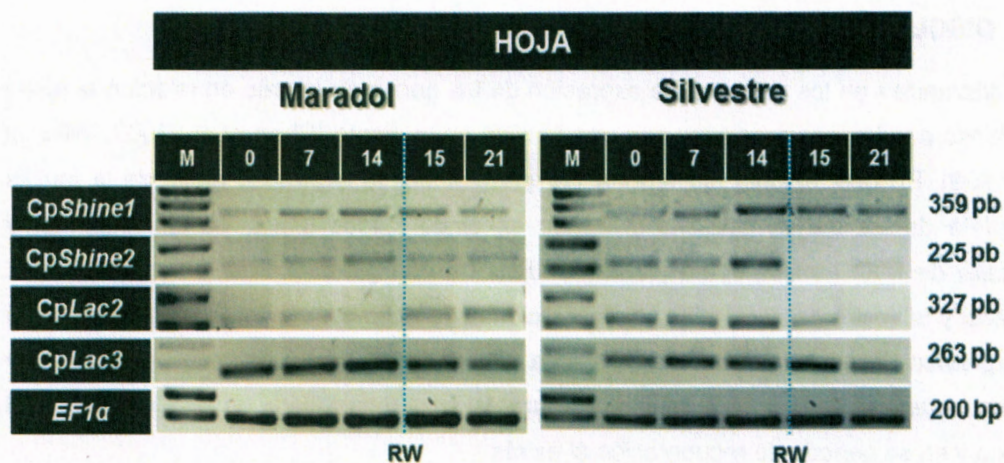


Figura V.9. Expresión de 4 genes en Hoja de plantas jóvenes de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre expuestas a diferentes tratamientos por déficit hídrico (recuadros superiores) que fueron de: 0, 7 y 14 d y a dos periodos de recuperación: 1 d y 7 d. Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números del margen derecho indican el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue *CpEF1α*. El marcador de peso molecular (M) utilizado fue de 1Kb plus. Se señala el punto de rehidratación (RW) al día 15 de iniciado el tratamiento. Gel de Agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio.

V.6. DISCUSIÓN

Las diferencias en los patrones de expresión de los genes de interés en relación al tejido analizado pueden ser asociadas con una función en la planta (Chen *et al.*, 2003; Millar *et al.*, 1999). En este estudio, se reporta por primera vez la expresión basal de la familia completa de los genes *CpShine* y *CpLac* en cinco tejidos (Raíz, Tallo, Hoja, Flor y Cáscara de fruto inmaduro) en plantas adultas de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre desarrolladas bajo condiciones de riego constante. Además, se evaluó la expresión de estos genes en tres tejidos (Raíz, Tallo y Hoja) en plantas jóvenes de *Carica papaya* L. de ambos genotipos, durante su exposición a un estrés por déficit hídrico y en su periodo de recuperación al estrés.

En el análisis de expresión basal de plantas adultas de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre se observó que *CpShine2*, presentó una mayor expresión en los tejidos de Hoja y Flor. En *A. thaliana* se ha reportado la función del gen homólogo *SHN1/WIN1* por Xin Shi *et al.*, (2011), quienes silenciaron los genes de *SHN* y corroboraron su función en la formación de los órganos florales. Ellos obtuvieron por RT-qPCR que *SHN* tenía un mayor nivel relativo de transcritos con un valor de 4, en comparación con *SHN2* y *SHN3* con valores de 3 y 2 respectivamente. Los resultados obtenidos, indicaron que en particular *SHN1/WIN1*, juega un papel importante en la formación de la superficie de los órganos florales al controlar el metabolismo de los lípidos cuticulares y posiblemente estén asociados con los componentes de la pared celular. Nuestros resultados, indican que para *Carica papaya* L. la función de *CpShine1* y *CpShine2* se mantiene en el tejido de Flor debido a su alta expresión observada en el análisis basal de ambos genotipos.

Algunos de los resultados acá presentados contrastan con lo reportado por Aharoni *et al.* (2004) quienes sobre expresaron a los miembros del clado *SHINE* en *A. thaliana* para evaluar su posible papel en la biosíntesis de la cutícula como una respuesta al estrés por déficit hídrico. Para analizar la expresión de los genes *SHINE*, obtuvieron para cada gen un constructo con el gen reportero de β -glucuronidasa (GUS) y evaluaron la expresión de los genes en diferentes tejidos de plantas control de *A. thaliana*. En general, se detectó la expresión de GUS en todos los órganos y en algunos casos se observó una superposición en los patrones de expresión, mientras que para otros se obtuvo una expresión específica en ciertas capas celulares. Los resultados indicaron que la expresión de *SHN1/WIN1* y

SHN3 se superpone en los órganos florales, la expresión de ambos genes es similar en las hojas pequeñas, en las hojas primordiales y en las raíces. Por otra parte no observaron expresión de *SHN1/WIN1* y *SHN2* en tallo y hojas caulinas, mientras que la expresión de *SHN3* pudo ser observada en estos tejidos. A diferencia de lo reportado por Aharoni *et al.* (2004), nuestros resultados señalan una expresión baja de *CpShine1* en todos los tejidos analizados (Raíz, Tallo, Hoja, Flor y Cáscara de Fruto), con una menor intensidad de banda en tejido de Raíz. Por otra parte, *CpShine2* presenta de igual forma expresión en todos los tejidos, siendo la mayor expresión observada en Hoja y Flor de los dos genotipos. En condiciones de estrés por déficit hídrico (14 d) la expresión de *CpShine2* parece ser altamente específica para Tallo y Hoja, además que responde al estrés por déficit hídrico al día 14. La especificidad de *CpShine2* también fue reportada por Aharoni *et al.*, (2004) quienes sugieren que la especificidad de *SHN2* puede darnos evidencia importante sobre la funcionalidad de este gen.

Por otra parte, Wang *et al.* (2012) caracterizaron al gen *OsWR1* en *Oryza sativa* (homólogo de *SHN1/WIN1* de *A. thaliana*), en respuesta a un estrés inducido por déficit hídrico, ABA y salinidad. Mediante un análisis de RT-qPCR evaluaron la expresión del gen *OsWR1* en diferentes tejidos de plantas jóvenes y plantas adultas expuestas a un estrés por déficit hídrico. Los datos obtenidos muestran que los transcritos de *OsWR1* fueron altamente expresados en Hoja y Tallo de las plantas jóvenes, en comparación con la expresión en Raíz en donde el número de transcritos fue menor. Por el contrario, el análisis de expresión en plantas adultas, detectó expresión de *OsWR1* en Hojas, Vainas y Entrenudos, siendo mayor en el tejido de Hoja. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Wang, las diferencias en los patrones de expresión de *CpShine1* fueron observables para los tejidos de Hoja y Tallo en el tiempo de máximo estrés (d 14) a diferencia del día 0 en donde la expresión fue baja, al igual que *OsWR1* en arroz, y comparado con ambos genotipos fue mayor en Silvestre. A diferencia de lo reportado por Wang *et al.*, (2012), nosotros encontramos una mayor expresión de *CpShine1* en las raíces de las plantas expuestas a un estrés de 14 días pertenecientes al genotipo Silvestre.

En un estudio realizado en 2012 (Xin Shi *et al.*) se evaluó la expresión de los miembros de la familia completa *SHINE* en frutos de *Solanum lycopersicum*, con el objetivo de determinar la función de estos genes en la formación de la cutícula durante el desarrollo

del fruto. De acuerdo al análisis por RT-qPCR, se encontró una mayor expresión de *SHN3* en el exocarpo a diferencia de *SHN1* y *SHN2*, en base a esta diferencia en el número de transcritos y su posible papel en la formación de la cutícula en el fruto, decidieron estudiar solamente el papel de *SHN3*, para lo cual silenciaron el gen y obtuvieron frutos con alteraciones morfológicas significativas en la epidermis de los frutos y una disminución considerable en los lípidos cuticulares, con lo que demostraron el papel de *SHN3* en la formación de la cutícula en los frutos. Sí bien, en nuestro análisis *in silico* no se encontraron homólogos de *SHN3* en *C. papaya* L., sin embargo, en el análisis basal se incluyó tejido de Cáscara de Fruto Inmaduro para evaluar la expresión de *CpShine1* y *CpShine2*, los resultados obtenidos indican una expresión baja de estos genes en ambos genotipos es baja, esto quizás se deba, al estado de desarrollo del que fueron tomados los frutos (inmaduro) por lo que la cantidad de cutícula presente y por ende la expresión de los genes *CpShine1* y *CpShine2* fue menor. Se deben realizar estudios posteriores en la cáscara de frutos que presenten una madurez de consumo para que los resultados sean comparables y se discuta si en efecto, la menor expresión de estos genes se debe al estado de desarrollo del fruto o se deba a que éstos genes no se encuentran involucrados en la formación de la cutícula en frutos de *Carica papaya* L.

A la fecha no se tienen reportes sobre los patrones de expresión de *CpShine1* y *CpShine2* en tejido de Raíz en plantas de *A. thaliana*, si bien se han hecho estudios referentes a su ubicación no se han evaluados su expresión. Los resultados obtenidos en este estudio señalan una diferencia en la expresión de *CpShine1* en tejido de Raíz, observando una mayor expresión al día 14, tiempo máximo de estrés por déficit hídrico en el genotipo Silvestre, a diferencia, de Maradol en donde la expresión es baja en todos los tiempos. Es probable que estas diferencias en los patrones de expresión, puedan relacionarse con la rápida respuesta por parte del genotipo Silvestre que le permiten tolerar condiciones de estrés por déficit hídrico.

Por otra parte la alta expresión de *CpShine2* en Hoja de una planta Silvestre en comparación a Maradol, expuesta a 14 días de estrés por déficit hídrico sugiere que la expresión de este gen permite que el genotipo Silvestre tenga una mayor tolerancia al estrés, que se ve reflejado en el aumento en la cantidad de ceras cuticulares.

Los tres miembros del clado difieren en los patrones de expresión espacial y temporal, lo que sugiere que cada uno de ellos juega una función importante en varios órganos o bajo

diferentes condiciones, sin embargo, es posible que los miembros del clado actúen de manera combinada para proteger las capas internas y externas de la planta de influencias en el ambiente que puedan interactuar a través de sistemas de control hormonal, como el Etileno, Ácido Abscísico y Jasmonatos (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). En contraste con lo observado en *A. thaliana*, en Trigo (*Triticum durum*) se hizo una mutante con un ortólogo de *SHN1/WIN1* (Nud), el daño observado fue un cambio severo en la morfología en los cariósides. Nud ha sido propuesto como el gen clave para la disposición de los lípidos en la epidermis del pericarpo que permite la formación de las cariósides en una fusión post-genital normal similar (Panikasvili *et al.*, 2010; Taketa *et al.*, 2008; Lolle *et al.*, 1998). El trabajo realizado con un ortólogo en trigo, enfatiza que se deben hacer más elucidaciones para conocer los genes corriente abajo del clado *SHINE* y su conexión precisa en la formación de la cutícula en el desarrollo de la planta, por lo que se requiere una caracterización profunda de los genes del clado, en el que se pueden utilizar mutantes dobles o triples para eliminar las funciones redundantes y estudiar la función de un gen *SHN* en particular (Broun *et al.*, 2004).

A la fecha se sabe que los genes *SHN* codifican para un factor de transcripción AP2/ERF, y la caracterización de dos de sus homólogos ha incluido un análisis detallado de su función y los patrones de expresión, que sugieren que los genes pertenecientes a este clado actúan en la regulación de la biosíntesis de los lípidos requerida para la protección de las plantas a un estrés ambiental, en el desarrollo de los órganos florales y ante un daño. Nuestros resultados apoyan lo descrito en la literatura y aportan información importante en los patrones de expresión de *CpShine1* y *CpShine2* en tejido de Raíz expuesto a un estrés por déficit hídrico, lo que sugiere su función puede estar relacionada con un mecanismo de protección a un estrés por déficit hídrico.

Un estudio subsecuente realizado en *A. thaliana* indicó que los genes *SHN1/WIN1* controlan la permeabilidad de la cutícula regulando la expresión de otros genes involucrados en la biosíntesis de la cutina, particularmente *LACS2* (LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 2) (Kannangara *et al.*, 2007). La inducción en la formación de ceras en las hojas por una sobre expresión de cada uno de los genes fue sugerida como un segundo paso en la ruta de biosíntesis de las ceras, posiblemente *SHINE* por un proceso indirecto que sigue a la biosíntesis de la cutina (Xin Shi *et al.*, 2011). En función de esto, y sabiendo que en efecto nuestros resultados sobre los genes *SHINE* coinciden con lo

reportado en la literatura sobre su papel en la biosíntesis de la cutícula, adicionalmente, se evaluaron dos genes pertenecientes a la familia *LACS* (LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE). De acuerdo al análisis *in silico* realizado se aislaron dos secuencias para *C. papaya* L., denominadas *CpLac2* y *CpLac3*.

Los patrones de expresión de *CpLac2* coinciden con lo reportado por Schnurr *et al.* (2004) quienes propusieron a *LACS2* como esencial para el desarrollo de la cutícula en *A. thaliana* mediante la obtención de una mutante del gen (*lacs2*), observando efectos pleiotropicos en la planta como: disminución en el tamaño de las hojas y en los niveles de ceras totales. Nuestros resultados, señalan el aumento en la expresión de *CpLac2* en tejido de Hoja que es mayor en las plantas expuestas al estrés por déficit hídrico, esto confirma su papel en la acumulación de ceras totales en las hojas de *C. papaya* L. expuestas al estrés y es más evidente en el genotipo Silvestre lo que concuerda con una mayor tolerancia al estrés.

V.7. CONCLUSIONES

- El análisis de la expresión basal de los 4 genes (*CpShine1*, *CpShine2*, *CpLac2* y *CpLac3*) en los diferentes tejidos de plantas adultas de dos genotipos de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre, indican que *CpShine1* presenta una baja expresión constitutiva en todos los tejidos de las plantas adultas de ambos genotipos. Por el contrario, *CpShine2* parece tener una función más específica en los tejidos de Hoja y Flor. Un patrón similar fue observado en *CpLac2* con una mayor expresión en los tejidos de Hoja y Flor, contrastando con la expresión alta constitutiva de *CpLac3* en todos los tejidos.
- No se observaron diferencias en los patrones de expresión basal entre los genotipos Maradol y Silvestre, lo que indica que bajo condiciones de riego constante el nivel de los transcritos presentes se mantiene. Sin embargo una vez que la planta es expuesta a un estrés por déficit hídrico, se observa una diferencia en los patrones de expresión de los genes evaluados, siendo más contundente para *CpShine2* y *CpLac2*, lo que sugiere el papel de estos dos genes en la acumulación de ceras totales que podrían estar relacionadas con la tolerancia al estrés hídrico por parte del genotipo Silvestre, específicamente en la biosíntesis de ceras cuticulares en los tejidos de Hoja y Flor.
- *CpShine1*, tuvo una mayor expresión en los tejidos analizados en el genotipo Silvestre en comparación con Maradol, sin embargo para ambos casos la expresión de este gen en tallo sugieren una mayor participación en la biosíntesis de ceras en tallo.
- El patrón de expresión observado para el gen *Cpshine2* en el tejido de hoja es de particular interés. En el caso del genotipo Maradol, la intensidad de banda se mantuvo constante en los primeros tiempos de exposición, observándose una intensidad mayor al día 14, misma que disminuye una vez iniciado el tratamiento de recuperación. Sin embargo, el aumento en su expresión en el genotipo Silvestre es más notorio en el tratamiento máximo de estrés (14 d) y la disminución en la intensidad de banda inmediatamente después de iniciado el periodo de recuperación ocurre del mismo modo que Maradol; por lo que lo hacen candidato

para ser estudiado como el responsable del aumento en la cantidad de ceras totales en las hojas de *Carica papaya* L.

- La expresión diferencial de *CpLac2* en los tejidos de raíz y hoja sugiere que este gen se encuentra involucrado en la biosíntesis de las ceras, ya que su aumento en la expresión en el tiempo de mayor estrés (d14) y la disminución de la intensidad de la banda una vez que se inicia el periodo de recuperación es más notorio en Silvestre a diferencia de Maradol que a pesar de presentar un patrón de expresión similar, la intensidad de banda sugiere que el nivel de transcritos no es el mismo.
- La expresión del *CpLac3* fue constante en los tres tejidos evaluados en ambos genotipos lo que sugiere que este gen tiene una expresión constitutiva y que por ende no está involucrado directamente en la biosíntesis de ceras, ya que no aumenta o disminuye su expresión ante la exposición al estrés.
- Los cambios en los patrones de expresión analizados indican que *CpShine2* y *CpLac2* responden ante la exposición de la planta a un estrés por déficit hídrico, lo que sugiere que la diferencia en cuanto la capacidad de tolerar un estrés por 14 días de déficit hídrico por parte del genotipo Silvestre, se deba en parte a que es capaz de prender genes relacionados con una mayor tolerancia a dicho estrés, que a su vez dispare un aumento en las ceras, evitando la pérdida de agua por transpiración y de esta manera mantiene turgencia en los tejidos. Sin embargo, no se puede concluir contundentemente que estos genes sean los únicos responsables del aumento en la cantidad de ceras totales en hojas de papaya debido a la complejidad de la ruta de biosíntesis de ceras y la redundancia de los genes del clado *SHINE*. No obstante, nuestros resultados confirman su papel en la formación de los órganos florales y dentro de la ruta de biosíntesis de ceras en *Carica papaya* L., que es una respuesta fisiológica de la planta ante un estrés por déficit hídrico y que es más evidente en las plantas Silvestre expuesta a un estrés de 14 días sin riego.

V.8. BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel y A. Pereira (2004). The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**. 2463-2480.
- Bach L, Faure JD (2010) Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *Comptes Rendus Biologies* 333:361–370.
- Bargel H, Koch K, Cerman Z, Neinhuis C. 2006. Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes – a smart material? *Functional Plant Biology* **33**: 893–910.
- Broun, P. (2004). Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**:202–209.
- Broun, P., O. Poindexter, E. Osborne, C.Z. Jiang y J.L. Riechmann (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl cad Sci USA* **101**: 4706–4711.
- Chen, X., S.M. Goodwin, V.L. Boroff, X. Liu y M.A. Jenks (2003), Cloning and characterization of the WAX2 gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell*, **15**:1170–1185.
- DeBono A, T H Yeats, J K C Rose, D Bird, R Jetter, L Kunst, L Samuels (2009). *Arabidopsis* LTPG is a glycosyl phosphatidylinositolanchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *Plant Cell*. **21**:1230-1238.
- Domínguez, E., J.A. Heredia-Guerrero y A. Heredia (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol*, **189**:938-949.
- Hen-Avivi, S. J. Lashbrooke, F. Costa y A. Aharoni (2014). Scratching the surface: genetic regulation of cuticle assembly in fleshy fruit. *J. Exp. Bot.*, **65**(16): 4653-4664.
- Isaacson T, D K Kosma, A J Matas, G J Buda, Y He, B Yu, A Pravitasari, J D Batteas, R E Stark, M A Jenks, J K C Rose (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle

- consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J.* **60**:363-377.
- Jeffree, C.E. (2006). The fine structure of the plant cuticle, in: *Biology of the Plant Cuticle*. Riederer, M y C. Müller (eds). Julius-vonSachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg. Germany. pp.11-110.
- Jetter, R., L. Kunst y L. Samuels (2006). Composition of plant cuticular waxes, in: *Biology of the Plant Cuticle*. M. Riederer y C Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:145-175.
- Judy Schnurr, J. J. Shockey y J. Browse (2004). The Acyl-CoA Synthetase Encoded by LACS2 Is Essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**: 629-642.
- Kannangara, R., C. Branigan, Y. Liu, T. Penfield y V. Rao (2007) The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 1278–1294
- Kunst, L., R. Jetter y L. Samuels (2006). Biosynthesis and transport of plants cuticular waxes: En: *Biology of the Plant Cuticle*. M Riederer, C Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:182-207.
- Kunst, L., y A. L. Samuels (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* **42**:51-80.
- Kutschera U, Niklas KJ (2007) The epidermal-growth-control theory of stem elongation: An old and a new perspective. *J Plant Physiol.*, **164**: 1395–1409.
- Lee, H., L. Xiong, M. Ishitani, B. Stevenson y J.K. Zhu (1999). Cold-regulated gene expression and freezing tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Plant J.*, **17**:301–308.
- Lolle SJ, Hsu W, Pruitt RE (1998) Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 607–619.

- McCourt RM, Delwiche CF, Karol KG. 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 661–666.
- Millar, A.A., S. Clemens, S. Zachgo, E.M. Giblin, D.C. Taylor y L. Kunst (1999). CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell*, **11**:825–838.
- Nawrath C (2002) The biopolymer cutin and suberin. In: Somerville CR , Myerowitz EM, eds. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.
- Panikashvili D, Shi JX, Bocobza S, Franke RB, Schreiber L, *et al.* (2010) The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Mol Plant* **3**: 563–575
- Panikashvili, D., S. Savaldi-Goldstein, T. Mandel, T. Yifhar, R.B. Franke, R. Hofer, L. Schreiber, J. Chory y A. Aharoni (2007). The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 Transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.*, **145**:1345-1360.
- Pollard M, Beisson F, Li YH, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**: 236–246.
- Reina-Pinto JJ, Yephremov A (2009) Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol Biochem* **47**: 540–549.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R (2008) Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Ann Rev Plant Biol* **59**: 683–707.
- Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* **446**: 199–202.
- Suh, M.C., A.L. Samuels, R. Jetter, L. Kunst, M. Pollard y J. Ohlrogge (2005) Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. *Plant Physiol.*, **139**:1649–65.
- Tafolla, A., J.C. González, L.A. Tiznado, H.M. Zacarías y S.M. Báez (2013). Composition, physiology and biosynthesis of plant cuticle. *Rev. Fitotec. Mex.*, **36**(1): 3-12.
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 672 p.

- Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, *et al.* (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 4062–4067.
- Wang, Y., L. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, R. Quan, S. Zhou y R. Huang (2011). An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Mol Biol*, **78**: 275-288.
- Yeats T H, K J Howe, A J Matas, G J Buda, T W Thannhauser, J K C Rose (2010). Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *J. Exp. Bot.*, **61**:3759-3771.

CAPÍTULO VI

VI.1. DISCUSIÓN GENERAL

A nivel mundial, el fruto de *Carica papaya* L. es de gran importancia económica y su cultivo se extiende a las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Al igual que otros cultivares, *C. papaya* L. no se encuentra exenta de diferentes tipos de estrés biótico y abiótico que afectan en gran medida su productividad. En este punto, el estrés por déficit hídrico es un factor limitante en el rendimiento de papaya, tan sólo, durante su etapa de producción, necesita una lámina de riego de 1 500 L en zonas áridas, elevando así los costos en su producción (Muñoz y Martínez, 2008).

A pesar de la importancia mundial de *C. papaya* L., a la fecha existen pocos reportes que incluyan aspectos fisiológicos, bioinformáticos y moleculares que permitan estudiar genes involucrados en las respuestas ante un estrés por déficit hídrico. Es por ello, que en este estudio, procedimos a realizar un análisis bioinformático, morfológico, fisiológico y molecular de los genes involucrados en la respuesta de la planta ante un estrés por déficit hídrico y su respuesta a nivel fisiológico, con el objetivo de obtener un marco de referencia sobre los posibles mecanismos de adaptación relacionados al estrés por déficit hídrico en especies tropicales. Adicionalmente, se planteó trabajar con dos genotipos de *C. papaya* L. susceptible (Maradol) y uno tolerante (Silvestre), basándonos en estudios previos realizados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular que indicaron que el genotipo Silvestre presenta mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico (Fuentes, 2006; datos no publicados).

El estudio de un genotipo Silvestre puede aportar mayor información sobre mecanismos de adaptación que se han perdido por la domesticación de la especie (Ming, 2014). Por lo tanto, la caracterización y comparación de las afectaciones a *C. papaya* L. de ambos genotipos y su respuesta ante un estrés por déficit hídrico a nivel anatómico, fisiológico y molecular constituyen un estudio pionero que aporta información importante para futuras investigaciones.

VI.1.1. Análisis bioinformático y búsqueda de los genes *SHINE* y *LACS* para el estudio de su expresión bajo estrés por déficit hídrico en dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre

A la fecha se han descrito varios FT involucrados en el estrés por déficit hídrico, en 2004 Aharoni *et al.*, estudiaron la sobreexpresión de los genes *SHINE* miembros de la súper familia AP2/ERF en *Arabidopsis thaliana*, observando que los fenotipos resultantes presentan un incremento en la composición de lípidos, alterando las propiedades de la epidermis, reduciendo la permeabilidad de la cutícula y el número de estomas, lo que confiere una tolerancia al estrés por déficit hídrico y una recuperación exitosa al ser reincorporado el riego (Xin Shi *et al.*, 2011; Aharoni *et al.*, 2004).

Para estudiar el estrés por déficit hídrico en diferentes tiempos de exposición en dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre, se inició con el asilamiento *in silico* de las secuencias nucleotídicas *SHINE* homólogas a las de *Arabidopsis thaliana* dentro del genoma secuenciado de *C. papaya* L. var. SunUp. En base al análisis bioinformático realizado en el Capítulo II, se encontraron en total de 2 secuencias nucleotídicas homólogas a *SHINE* dentro del genoma de *C. papaya* L. var. SunUp, respaldadas por porcentajes de identidad mayores a 70% y de similitud mayores al 75%, con valores esperados de $E=10^{-10}$. La presencia de las secuencias *SHINE* en el genoma de *C. papaya* L. var. SunUp, *Oryza sativa* y *Solanum lycopersicum* da una evidencia de la conservación de estas secuencias (Xin Shi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011; Kannangara *et al.*, 2007; Aharoni *et al.*, 2004). A partir de los alineamientos realizados, se observó que las secuencias *CpShine* presentaron dominios conservados en relación a las secuencias proteicas de *A. thaliana*. Los dominios mejor conservados fueron el dominio AP2, N-terminal ("mm") y C-terminal ("cm"), firma característica del clado, que es consistente con la literatura (Kannangara *et al.*, 2007, Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004). Para el caso de los genes *LACS*, también se realizó el análisis *in silico* y se seleccionaron las secuencias homólogas a los genes *AtLac2* y *AtLac3*, involucrados en la biosíntesis de ceras y regulados corriente arriba por los genes *SHINE*. Las secuencias aisladas en el genoma de papaya, nombradas *CpLac2* y *CpLac3*, fueron respaldadas por porcentajes de identidad y similitud mayores al 75%. De acuerdo al alineamiento realizado, se encontró la presencia de una región conservada correspondiente al dominio

de unión AMP. La presencia de la firma característica en el alineamiento sugieren que las secuencias identificadas en *C. papaya* L. en efecto corresponden a la familia LACS. A partir de las secuencias obtenidas para *C. papaya* L. se diseñaron los juegos de oligonucleótidos específicos para ambas familias (*CpShine1*, *CpShine2*) y (*CpLac2*, *CpLac3*) que fueron utilizados en el análisis de los patrones de expresión realizado en el Capítulo V.

VI.1.2. Efecto sobre la fisiología en dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre por la exposición a un estrés por déficit hídrico

El estrés por déficit hídrico en la planta ocurre cuando la cantidad de agua que se evapora mediante la transpiración es superior a la que se incorpora a través de la absorción por las raíces. De manera general, el estrés por déficit hídrico genera una disminución en varios parámetros fisiológicos que afectan el crecimiento de la planta; a la fecha, varios autores señalan a *C. papaya* L. como una planta tolerante al estrés por déficit hídrico. En una planta de papaya, el mecanismo de respuesta al estrés por déficit hídrico consiste en posponer la deshidratación mediante una regulación estomática estricta, reparación de la cavitación y un ajuste osmótico intenso (Mahouachi *et al.*, 2006; Marler, 1998). En el presente estudio, se procedió a realizar la caracterización morfológica y fisiológica de plantas jóvenes de *C. papaya* L. de un genotipo susceptible (Maradol) y uno tolerante (Silvestre), expuestas a un tratamiento de estrés por déficit hídrico en diferentes lapsos de tiempo, además, se evaluó su capacidad de recuperación una vez que el riego fue reincorporado. Los cambios registrados a nivel fisiológico y morfológico se encuentran esquematizados en la Figura VI.1 y son descritos a continuación:

Las primeras afectaciones observadas fueron a nivel morfológico. En ambos genotipos, se observó un aumento en la tasa de abscisión foliar seguida por la disminución en los valores de crecimiento relativo. Ambas afectaciones son consideradas como respuestas tempranas de la planta, como un esfuerzo por reducir el área de transpiración; para ambos casos la tasa de crecimiento se redujo en un 20%. Nuestros datos indican que ante un estrés por déficit hídrico, las plantas del genotipo Tolerante, son capaces de conservar por más tiempo (7 días) un número mayor de hojas, a diferencia de Maradol que pierde en el mismo tiempo el 30% de sus hojas, y después de 14 días sin riego pierde el 75% de sus hojas en comparación a Silvestre que tan sólo pierde el 50%. La abscisión

de hojas en respuesta al estrés por déficit hídrico, quizás sea un comportamiento esperado para ambos casos (Agbicodo *et al.*, 2009). Sin embargo, las diferencias significativas encontradas en cuanto el número de hojas adheridas al tallo en cada uno de los tiempos evaluados en ambos genotipos, nos proporcionan información importante que puede relacionarse con la afectación de otros parámetros fisiológicos, en específico con la tasa de fotosíntesis. Además, al ser extrapolado a condiciones de campo puede significar una pérdida importante de biomasa necesaria, para el aporte de fotosintatos a la planta que reduce en gran medida el rendimiento de la planta.

Otro de los cambios morfológicos documentados, que se relaciona con la disminución de la división celular y que nos habla de una diferencia en la respuesta al estrés por parte de ambos genotipos, es la longitud de la raíz que fue mayor en Silvestre (18 cm) a diferencia de Maradol (10 cm). El aumento en la longitud de la raíz ante un estrés por déficit hídrico, ha sido señalado por algunos autores como una respuesta de tolerancia en donde la planta busca aumentar su área de exploración radial, para acceder a zonas más profundas en el sustrato en busca de agua, para lo cual es necesario detener su crecimiento aéreo, no así el de la raíz (A) (Ivonne y Mirando, 2007).

Ante un estrés por déficit hídrico causado por la eliminación del riego, el potencial hídrico (Ψ_H) de las hojas es de los primeros parámetros afectados, lo que puede relacionarse con el grado de estrés al que se encuentra sometida la planta. Los valores obtenidos de la medición del Ψ_H en hojas, indican una variación en el Ψ_H durante el experimento lo que sugiere que en efecto, las plantas estuvieron estresadas. En el caso del genotipo Maradol, el Ψ_H pasó de -1 MPa al día 0 a -1.8 MPa al día 14 sin riego, por el contrario la planta Silvestre, registró para los mismos tiempos valores de -1 y -1.5 MPa respectivamente. En general, se observó que el potencial hídrico en ambos casos alcanzó valores cercanos al punto de marchitez permanente (-1.5 MPa), reportado como el punto crítico en el que el potencial de turgencia no puede recuperarse aún después de reincorporado el riego. Lo que sugiere que *C. papaya* L. es una planta tolerante, ya que puede alcanzar los valores de PMP sin perder turgencia en los tejidos ante un estrés por déficit hídrico, además es capaz de mantener su tasa fotosintética aún con potenciales hídricos bajos y durante el periodo de recuperación es capaz de detectar el cambio en el Ψ_H y reestablecer varios de los parámetros afectados por el estrés (A).

Carica papaya L., ha sido reportada como una planta capaz de tolerar el estrés por déficit hídrico, mediante mecanismos de adaptación como un ajuste osmótico intenso, reparación de la cavitación y una regulación estomática estricta (Mahouachi *et al.*, 2006; Marler, 1998). En el presente estudio, se hizo énfasis en el cierre estomático como una respuesta al estrés por déficit hídrico regulado por el aumento de ABA. Nuestros resultados, señalan una disminución en los valores de conductancia estomática (gs) para ambos genotipos, alcanzando los valores más bajos ($0.002 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-2}$) al día 14 (tiempo de estrés máximo por déficit hídrico); lo que sugiere un cierre estomático total debido al estrés (B). Sin embargo, es importante subrayar el comportamiento observado en Silvestre un día después de iniciar el periodo de recuperación, donde se observó un aumento en la conductancia que alcanzaron los valores iniciales en los primeros días de reincorporado el riego, caso contrario a lo que se observó en Maradol en donde la respuesta a la rehidratación fue más lenta. La rápida respuesta por parte del genotipo Silvestre le permite tener un mejor aprovechamiento en la fijación del CO_2 en la planta lo que se ve reflejado en su capacidad de reestablecer los valores de fotosíntesis durante los primeros días de aplicar nuevamente el riego.

La conductancia estomática aporta información sobre la apertura de los estomas, que controla en la hoja procesos internos fundamentales para el desarrollo vegetal como el intercambio de CO_2 necesario para la fotosíntesis y el vapor de agua en la transpiración (Raschake, 1975). La disminución en la tasa de conductancia estomática está relacionada con la pérdida de turgencia pero también se relaciona con el aumento en la concentración de Ácido Abscísico (ABA) que se acumula en el apoplasto que rodea a las células epidérmicas de la hoja, las células guardas reconocen a ABA y responden cerrando los estomas (Liang *et al.*, 1997, Cowing *et al.*, 1993). Nuestros resultados, revelan que la regulación estomática estricta es una de las respuestas fisiológicas que siguen las plantas de *C. papaya* L. ante un estrés por déficit hídrico, y que además esta regulación parece ser más eficiente en el genotipo Silvestre lo que le permite tolerar el estrés y continuar con los procesos fotosintéticos (B).

En general, la disminución en la tasa de intercambio gaseoso como consecuencia del cambio en el potencial hídrico del suelo, afecta los valores de fotosíntesis en las plantas (C). Nuestros resultados señalan que el genotipo Silvestre es capaz de tolerar un periodo de 7 días de estrés por déficit hídrico, sin que éste afecte su tasa fotosintética, mientras

que para las plantas Maradol los valores de fotosíntesis se reducen en un 85%. A pesar de que ambos genotipos registraron los valores más bajos de fotosíntesis al día 21, una vez de reincorporado el riego las plantas Silvestre alcanzaron valores equiparables con las plantas control, caso contrario a Maradol que registró una tasa fotosintética significativamente menor a Silvestre. La capacidad de recuperación tanto de Maradol y Silvestre nos indican que ambos genotipos son tolerantes al estrés por déficit hídrico impuesto, sin embargo la rápida respuesta por parte del genotipo Silvestre a una rehidratación la señalan como el más tolerante. Esta capacidad de recuperación puede relacionarse con que el genotipo Silvestre detecta más rápido el cambio de Ψ_H en el suelo, al tener una sistema radicular mayor puede extender su área de búsqueda de agua e incluso puede relacionarse más al hecho de que a diferencia del genotipo Maradol, Silvestre retiene un mayor número de hojas por más tiempo, permitiéndole reestablecer los valores de fotosíntesis al primer día de reincorporado el riego.

En este mismo punto, se analizaron los valores de F_v/F_m para determinar un daño en el PSII ocasionado por el estrés por déficit hídrico, sin embargo no se detectaron diferencias significativas durante todo el experimento y tampoco entre los genotipos D), esto indica que el estrés por déficit hídrico, sensibiliza al aparato fotosintético por el aumento en la incidencia de luz y provoca una inhibición de la fotosíntesis lo que puede preceder a cualquier cambio apreciable en la fluorescencia de clorofila a (Björkman y Powles, 1984; Ludlow y Björkman, 1984). Lo antes descrito, nos lleva a la conjetura de que la reducción en la tasa fotosintética, se debe principalmente a la reducción del área disponible para la fijación de CO_2 , más que por un daño en el aparato fotosintético, que se ve reflejado en los valores de F_v/F_m que se mantienen constantes durante todo el experimento.

Otra de las respuestas fisiológicas evaluadas ante un estrés por déficit hídrico, es el aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan la membrana plasmática y que puede medirse de manera indirecta como % de fuga de electrolitos. En el presente estudio, se evaluó el % de fuga de electrolitos en membrana y se encontró que para ambos genotipos, el daño en membrana incrementó conforme el tiempo de exposición al estrés aumentaba y al día máximo de estrés (14 d), el daño en el genotipo Maradol fue mayor con un 50% en comparación a Silvestre que tan sólo registró un 36% de daño. Interesantemente una vez que el riego fue reestablecido durante una semana, el

% de fuga de electrolitos se redujo significativamente en el genotipo Silvestre, no así, en Maradol, lo que sugiere que Silvestre es capaz de reparar el daño en membrana en un tiempo menor una vez que se ha reincorporado el riego. En la literatura se ha reportado que la fuga de iones puede ser utilizado como marcador de tolerancia, al momento de elegir un genotipo tolerante a uno susceptible, en base a nuestros resultados, podemos deducir que el genotipo Silvestre presenta una mayor tolerancia en función del daño en membrana.

La capacidad de recuperación hasta el momento puntualizada por parte de Silvestre, nos lleva a la idea de que ambos genotipos han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación ante un estrés por déficit hídrico, producto quizás, de la domesticación de la especie. Uno de los mecanismos de respuesta que ha sido ampliamente estudiado y que es objeto de estudio de la presente tesis, es la cantidad de ceras totales presentes en las hojas en respuesta a la exposición de un estrés por déficit hídrico.

En el Capítulo IV, se evaluó el aumento en la cantidad de ceras totales presentes en las hojas de *C. papaya* L. en respuesta a la exposición a diferentes tiempos a un estrés por déficit hídrico. Los resultados obtenidos en esta parte del estudio, indicaron que el genotipo Silvestre tiene una mayor capacidad de acumular ceras de hasta un 71% en comparación de Maradol que solamente acumuló un 52% en el tiempo máximo de estrés evaluado. La diferencia en el contenido total de ceras, confirmada con el análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB) sugiere que el genotipo Silvestre presenta un contenido mayor de ceras, que puede relacionarse a una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico. El análisis por cromatografía de gases-masa (CG/MS), sugirió que esta capacidad de tolerancia está dada más por la composición química de los extractos, que estuvo conformada en su mayoría por Alcanos y Triterpenos. Al día máximo de estrés, se observó una relación 2:1 en cuanto la abundancia relativa de los Alcanos en el genotipo Silvestre en comparación a Maradol. Nuestros datos sugieren que al ser el grupo mayoritario en los extractos cerosos, los Alcanos, son los responsables de conferir una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico. Esta idea concuerda con lo reportado en la literatura que enfatiza el papel de los Alcanos, más que el de los Triterpenos en reducir la permeabilidad de la membrana, lo que se traduce en una menor difusión de agua a través de ella (E). El aumento en la cantidad de ceras como respuesta de la planta al estrés por déficit hídrico, reduce la pérdida de agua por transpiración, no solo por la vía estomática

sino también vía cuticular y además podría estar relacionada a lograr una mejor eficiencia en el uso del agua (WUE) (F).

La mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico por parte del genotipo Silvestre, sugiere que su eficiencia en el uso del agua es alta, sin embargo, al realizar las curvas correspondientes a la eficiencia del uso del agua, se observó que es el genotipo comercial y no el Silvestre el que tiene una mayor eficiencia en el uso del agua ($10 \mu\text{mol CO}_2$ por $\text{mmol de H}_2\text{O}$) a diferencia de Silvestre ($2 \mu\text{mol CO}_2$ por $\text{mmol de H}_2\text{O}$). Lo anterior contradice en mucho los resultados obtenidos hasta el momento, sin embargo, al analizar esta gráfica desde un punto de vista productivo, entendemos que para el caso del genotipo comercial, éste ha sido domesticado para que su principal objetivo sea la obtención de frutos en el menor tiempo posible lo que implica un mayor consumo de agua y mayor tasa fotosintética (reflejada en los valores del Capítulo III), sin importar las condiciones adversas del ambiente la demanda de CO_2 en la planta es alta al igual que su apertura estomática; por el contrario, las plantas Silvestre, al ser un genotipo no domesticado, aún conserva los mecanismos de adaptación que le permiten obtener frutos pequeños incluso en condiciones adversas, en dónde aún con baja disponibilidad de agua mantiene sus valores de fotosíntesis.

Nuestros resultados sugieren que la mayor tolerancia por parte del genotipo Silvestre y su rápida recuperación al estrés por déficit hídrico, evidente en la mayoría de los parámetros evaluados específicamente en fotosíntesis, se debe principalmente al aumento en el contenido de ceras totales, en específico, al aumento en la cantidad de Alcanos, que disminuyen la permeabilidad de la membrana; más que por un control estricto del cierre estomático. Sin embargo, para poder confirmar esta idea, son necesarios análisis adicionales como: las curvas de respuesta a CO_2 y Luz así como medir la tasa de transpiración de la cutícula, que nos ayuden a corroborar que la tasa de transpiración cuticular baja en función del aumento en la cantidad total de ceras presentes en la hoja.

VI.1.3. Efecto sobre los patrones de expresión de los genes *CpShine* y *CpLac* en dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre en respuesta a un estrés por déficit hídrico

Las diferencias en los patrones de expresión de los genes de interés en relación al tejido analizado pueden ser asociadas con su función en la planta (Chen *et al.*, 2003; Millar *et al.*, 1999). En el presente estudio, se reporta por primera vez la expresión basal de la familia completa de los genes *CpShine* y *CpLac* en cinco tejidos (Raíz, Tallo, Hoja, Flor y Cáscara de fruto inmaduro) en plantas adultas de dos genotipos de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre desarrolladas bajo condiciones de riego constante. Además se evaluó, la expresión de estos genes en tres tejidos (Raíz, Tallo y Hoja) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. de dos genotipos (Maradol y Silvestre), durante su exposición a un estrés por déficit hídrico y en dos periodos de recuperación. En los datos obtenidos, se observó una diferencia en la expresión de los genes *CpShine1*, *CpShine2* y *CpLac2*, en los tejidos de Raíz, Tallo y Hoja en ambos genotipos. Interesantemente, los patrones de expresión de *CpShine1*, *CpShine2* y *CpLac2* fue más evidente en el tejido de Hoja en las plantas Silvestre, en donde se observó una baja expresión de estos genes al día 0, sin embargo, al tiempo 7 se observó una expresión media que aumentó al día 14 que corresponde al día máximo de estrés, más interesante aún fue el hecho de que al primer día de incorporado el riego, la expresión de los genes *CpShine2* y *CpLac2* se redujo notablemente, por el contrario la expresión del gen *CpShine1* se mantuvo con la misma expresión en los últimos tiempos de recuperación evaluados.

Es posible que estas diferencia en los patrones de expresión se deba en parte a que el genotipo Silvestre sea capaz de prender genes relacionados con una mayor tolerancia a dicho estrés antes que Maradol, lo que favorece el aumento en la cantidad de ceras totales presentes en hojas, evitando la pérdida de agua por transpiración y de esta manera mantiene turgencia en los tejidos. Por el contrario, el estrés por déficit hídrico en el genotipo susceptible (Maradol) no causa un aumento en la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de ceras, por lo que acumula menor cantidad de ceras en hoja lo que no evita una pérdida de agua importante que se ve reflejada en una caída en la turgencia y mayor afectación en la fisiología de la planta y en su lenta recuperación una vez que ha sido reincorporado el riego.

VI.2. CONCLUSIONES GENERALES

- En base al análisis bioinformático realizado en el Capítulo II, se encontraron homólogos a los genes tipo *SHINE* reportados para *Arabidopsis thaliana* en *Carica papaya* L. var. SunUp, pertenecientes a la familia de factores de transcripción AP2/ERF. Un total de dos secuencias denominadas *CpShine1* y *CpShine2* fueron aisladas *in silico* con porcentajes de identidad mayores al 70% y con valores esperados de E entre 10^{-62} y 10^{-56} . Los alineamientos realizados entre las secuencias reportadas de *SHINE* para *A. thaliana* y las aisladas en este estudio presentaron los dominios conservados: AP2, "mm" y "cm"; firma característica de los miembros de esta familia. La presencia del dominio altamente conservado de AP2 nos da información sólida para concluir que las secuencias aisladas pertenecen a la familia de FT AP2/ERF, que podrían estar involucradas en la tolerancia al estrés por déficit hídrico.
- Ante un estrés por déficit hídrico, una serie de parámetros fisiológicos se ven afectados (Capítulo III). En este estudio se partió de la premisa que ante un estrés por déficit hídrico los valores de potencial hídrico disminuyen, lo que es un indicativo del estrés ocasionado por la suspensión del riego. Una vez analizados los cambios en los potenciales hídricos en Hoja, se documentaron los cambios morfológicos en la planta; abscisión foliar, tasa de crecimiento relativo, longitud de raíz; todos ellos en conjunto, sugieren que el genotipo Silvestre ha conservado mecanismos de adaptación que le permiten: 1. Disminuir el área de exposición al estrés (abscisión foliar), con lo que disminuyen su tasa de transpiración; 2. Reducir su tasa de crecimiento, para utilizar sus reservas en otros procesos que le permitan tolerar el estrés y 3. Aumentar la longitud de la Raíz que le permita acceder a agua en el suelo. Después, se analizó la respuesta fisiológica de ambos genotipos evaluando diferentes parámetros fisiológicos que en su mayoría aportaron información sobre el comportamiento de la planta durante el estrés y durante el periodo de recuperación, lo que brinda un primer estudio con la información necesaria para la caracterización del estrés en las plantas de dos genotipos de *Carica papaya* L.
- Los resultados obtenidos en el Capítulo III, sugieren que ambos genotipos son capaces de tolerar el estrés por déficit hídrico de 14 días y que además ambos responden al periodo de recuperación. Sin embargo, el daño ocasionado por el estrés por déficit

hídrico en el genotipo Silvestre es menor y esto lo demuestran los valores obtenidos en los diferentes análisis realizados (% de Fuga de electrolitos, Fv/Fm, Intercambio de gases, Número de estomas) en donde se observa que sí bien hay una disminución en los valores de ambos, es menor en el genotipo Silvestre. Aunado a ello, la capacidad de recuperación del genotipo Silvestre fue más evidente en las cinéticas de Pn a partir del primer día de reincorporado el riego, a diferencia de Maradol cuya recuperación en la cinética de Pn empezó hasta el día 7 de reincorporado el riego.

- Los resultados obtenidos del análisis fisiológico de ambos genotipos de *C. papaya* L. en diferentes tiempos de exposición y recuperación al estrés por déficit hídrico, nos llevan a la conclusión de que *C. papaya* L. es una especie tolerante al estrés por déficit hídrico, pero que la rápida respuesta del genotipo Silvestre durante el estrés y durante el periodo de recuperación, sugieren que Silvestre tiene una tolerancia mayor al estrés por déficit hídrico, debida quizás a que ésta no es un especie domesticada como el caso de Maradol y por tanto aún conserva los mecanismos de adaptación que le permiten sobrevivir en ambientes adversos.
- En el Capítulo IV, se caracterizó por primera vez la micromorfología de las ceras epicuticulares en hojas de *C. papaya* L., observándose que el tipo de cristales cerosos son similares en ambos genotipos y no presentaron cambios en su estructura ante un estrés por déficit hídrico, siendo la única diferencia la cantidad de ceras presentes en la superficie abaxial y adaxial. Los resultados obtenidos del análisis por MEB, coinciden en que el tipo de cristal ceroso no es determinante en la tolerancia al estrés hídrico, no así la cantidad de ceras totales extraídas en hojas de *C. papaya* L. Al analizar el rendimiento de ceras totales extraídas de hojas expuestas al estrés por déficit hídrico en ambos genotipos, se encontró que el genotipo Silvestre tuvo un rendimiento mayor (71%) en comparación con Maradol (52%) al día de estrés máximo lo que sugiere que la acumulación de ceras confiere parte de la tolerancia al estrés por déficit hídrico en Silvestre.
- Para poder correlacionar el aumento en la tolerancia con el incremento en la cantidad de ceras totales, se analizaron los perfiles cromatográficos obtenidos para cada extracto ceroso, observando que las ceras están compuestas en su mayoría por Alcanos y Triterpenos que en conjunto modifican la permeabilidad de la membrana, permitiendo en menor grado el paso de agua. La proporción de Alcanos encontrados

fue mayor en el genotipo Silvestre, esto, aunado al hecho de que son los Alcanos los principales responsables de disminuir la permeabilidad en la membrana, indican que el genotipo Silvestre tiene una mayor tolerancia al estrés, siendo su principal respuesta el aumento en la cantidad de ceras depositadas que en su mayoría están compuestas de Alcanos.

- De esta manera se concluye de manera contundente que el genotipo Silvestre tiene una mayor tolerancia al estrés, siendo su principal respuesta el aumento en la cantidad de ceras depositadas en hojas que ayudan a reducir la transpiración para evitar la pérdida de agua.
- Finalmente, en el Capítulo V, se analizaron las diferencias entre los patrones de expresión de los genes tipo *SHINE* en *Carica papaya* L. en un genotipo susceptible y uno tolerante. Primero, no se observaron diferencias en los patrones de expresión basal entre los genotipos Maradol y Silvestre, lo que indica que bajo condiciones de riego constante el nivel de los transcritos presentes se mantiene para ambos genotipos, sin embargo una vez que la planta es expuesta a un estrés por déficit hídrico se prenden. Interesantemente, se observaron diferencias en los patrones de expresión de los genes *CpShine1* y *CpShine2* en los tejidos de Hoja y Raíz bajo condiciones de estrés por déficit hídrico y que fue más notoria en Silvestre.
- Es posible que esta diferencia en los patrones de expresión de los genes *CpShine1* y *CpLac2*, se deba en parte a que el genotipo tolerante (Silvestre) es capaz de prender genes relacionados con una mayor tolerancia a dicho estrés, que a su vez ayude en la biosíntesis de ceras y que se vea reflejado en el aumento en la cantidad de ceras totales presentes en hojas, evitando la pérdida de agua por transpiración y de esta manera mantiene turgencia en los tejidos y le ayuda a recuperarse en el periodo de recuperación.
- Por el contrario el estrés por déficit hídrico en el genotipo susceptible (Maradol) no causa un aumento en la expresión en los genes involucrados en la biosíntesis de ceras, por lo que acumula menor cantidad de ceras en hoja, que no evita una pérdida de agua importante que se ve reflejada en una caída en la turgencia y mayor afectación en la fisiología de la planta y en su lenta recuperación una vez que ha sido reincorporado el riego.

VI.3. PERSPECTIVAS

La presente tesis reporta aspectos importantes sobre la fisiología y morfología de dos genotipos de *Carica papaya* L. expuestos a diferentes tratamientos de estrés hídrico y además intenta relacionar los patrones de expresión de los genes *CpShine* con la respuesta de la planta al estrés. No obstante, nuevas interrogantes surgen para las cuales se establecen las siguientes perspectivas.

Análisis Fisiológico

- Medir el contenido de Ácido Abscísico (ABA) en las hojas de plantas expuestas al estrés por déficit hídrico para poder relacionar los niveles de la hormona con el nivel de estrés al que se encuentra expuesta la planta.
- Incluir los valores de Ψ_T , para relacionar el nivel de estrés al que se encuentra expuesta la planta con el potencial de turgencia en hoja así como el Ψ_O .
- Determinar los valores de Contenido Relativo de agua en hojas, lo que permitiría relacionarlos con el Ψ_H .

Cuantificación de ceras totales

- En la presente tesis, se han establecido las bases para la extracción y cuantificación de ceras totales en hojas. En base a los cuales, podría evaluarse la cantidad de ceras totales presentes en fruto en función de los estados de maduración como una respuesta de tolerancia al ataque de patógenos y al daño mecánico

Análisis Molecular

- Llevar a cabo el análisis cuantitativo de los transcritos de los genes *CpShine1*, *CpShine2* y *CpLac2* mediante un análisis por RT-qPCR en los 3 tejidos evaluados
- Realizar ensayos de inmunolocalización de la proteína *CpShine*, que nos permitan identificar la ubicación de la proteína una vez que la planta se expone a un estrés por déficit hídrico.
- El papel de los genes tipo *LACS* en tejido específico ha sido ampliamente documentado en la literatura, por lo que sería interesante, hacer un estudio que permita evaluar los cambios en los patrones de expresión de la familia completa caracterizada *in silico* en el presente estudio tomando en cuenta todos los tejidos.

VI.4. BIBLIOGRAFÍA

- Agbicodo, E.M., C.A. Fatokun, S. Muranaka, R.G.F. Visser y C.G. Linden van der (2009). Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishment, and future prospects, *Euphytica*, **167**: 353-370.
- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel y A. Pereira (2004). The *SHINE* clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**. 2463-2480.
- Assmann, S.M. y K. Shimazaki (1999). The multisensory guard cell: stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol.*, **119**, 809–815.
- Björkman, O. y S.B. Powles (1984). Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: Interaction with light level. *Planta*, **161**: 490-504
- Broun, P., O. Poindexter, E. Osborne, C.Z. Jiang y J.L. Riechmann (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4706–4711.
- Ivonne, A. y D. Mirando (2007). Efecto de cinco sustratos sobre índices de crecimiento de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) bajo invernadero, *Rev. Col. C. Hort.*, **1**: 22-27.
- Kannangara, R., C. Branigan, Y. Liu, T. Penfield, V. Rao, G. Mouille, H. Höfte, P. Herman, R. Markus y J.L. Broun Pierre (2007). The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **19**: 1278-1294.
- Ludlow, M.M. y O. Björkman (1984). Paraheliotropic leaf movement in *Sirato* as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: Damage by excessive light and heat. *Planta*, **161**: 505-518.
- Mahouachi, J., A.R. Socorro y M. Talon (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil*, **281**: 137-146.

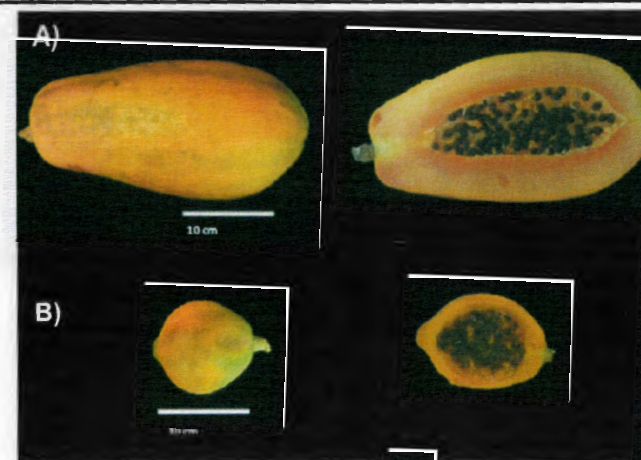
- Marler, T.E. y M.V. Mickelbart (1998). Drought, leaf gas exchange, and chlorophyll fluorescence of field-grown papaya. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **123**(4):714–718.
- Millar, A.A., S. Clemens, S. Zachgo, E.M. Giblin, D.C. Taylor y L. Kunst (1999). CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell*, **11**:825–838.
- Ming, R. y P.H. Moore (2014). *Genetics and Genomics of Papaya*. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models (10), Springer, New York. 9 pp.
- Muñozcano, M. y C.O. Martínez (2008). Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa, A.C. pp.1-13.
- Wang, Y., L. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, R. Quan, S. Zhou y R. Huang (2012). An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes. *Plant Mol. Biol.*, **78**:275-288.
- Xin Shi, J., A. Adato, N. Alkan, Y. He, J. Lashbrooke, A.J. Matas, S. Meir, S. Malitsky, T. Isaacson, D. Prusky, D. Leshkowitz, L. Schreiber, A.R. Granell, E. Widemann, B. Grausem, F. Pinot, J.K.C. Rose, I. Rogachev, C. Rothan y A. Aharoni (2013). The tomato *SlSHINE3* transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. *New Phytol.*, **197**:468-480.
- Xin Shi, J., S. Malitsky, S. De Oliveira, C. Branigan, R.B. Franke, L. Schreiber y A. Aharoni (2011). *SHINE* Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. *PLos Genet.*, **7**(5):371-388.
- Yang, J., M.I. Ordiz, J.G. Jaworski y R.N. Beachy (2011). Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata. *Plant Physiol. Biochem.*, **49**: 1448-1455.

VII.1. ANEXOS

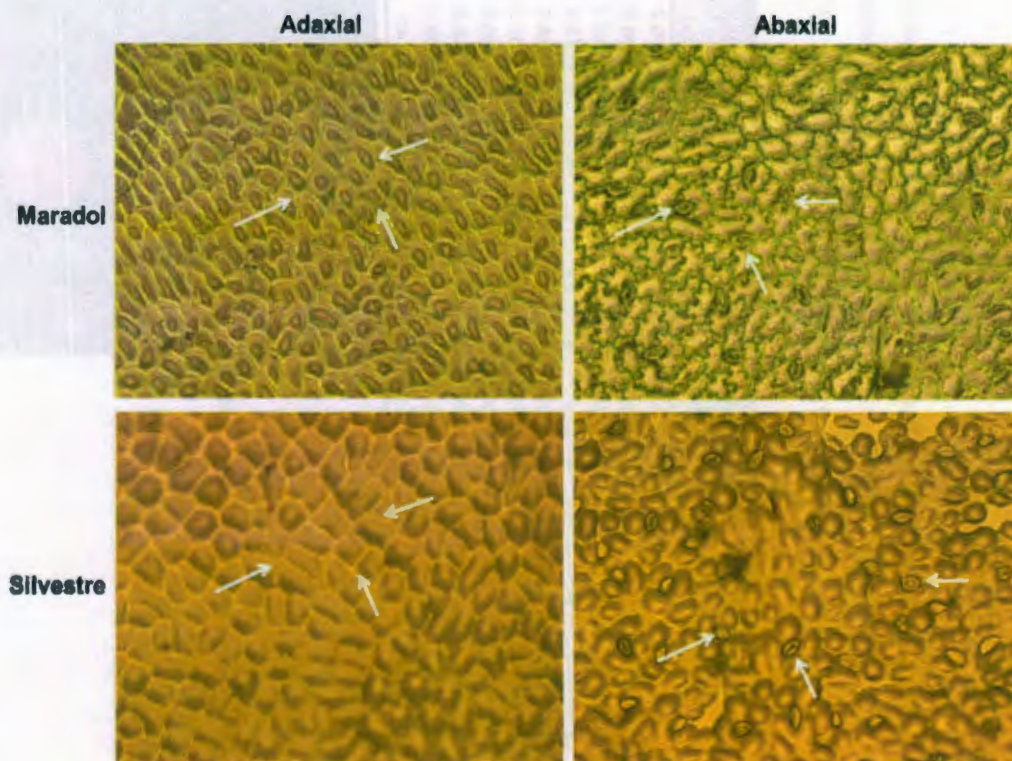
Anexo III.1. Caracterización morfológica de frutos colectados de *Carica papaya* L. colectados en diferentes localidades del Estado de Yucatán, el genotipo Maradol se colectó de una plantación comercial de papaya denominada "Rancho Tixcocab" ubicada en la localidad de Tixcocab, Yucatán; por su parte, los frutos del genotipo Silvestre se obtuvieron en el Km 30 de la carretera Mérida – Valladolid, Yucatán.

<i>Carica papaya</i> Maradol						<i>Carica papaya</i> Silvestre					
Fruto	Lmax (cm)	Dmax (cm)	Peso fruto (g)	Grosor Pulpa (cm)	Número de semillas	Fruto	Lmax (cm)	Dmax (cm)	Peso fruto (g)	Grosor Pulpa (cm)	Número de semillas
1	20	11	1053.4	3	644	1	6.4	5.3	79.7	1	353
2	22.5	12.5	1376.2	3.6	77	2	6.3	5.4	96.8	0.9	350
3	19.9	11	1270.7	2.5	689	3	6.9	5.6	105.7	0.9	357
4	20.2	11.6	1223.8	3.2	303	4	5.9	5.1	72.8	0.7	242
5	18.6	11.2	975.5	2.4	494	5	6.4	5.2	86.5	0.9	281
6	19.7	11.6	1038.7	2.7	356	6	6.1	5	67.3	0.7	212
7	19.1	10.3	733.8	3.1	323	7	6.6	4.8	85.6	0.9	313
8	20.3	10.8	1146.6	3	333	8	5.8	4.4	50.6	0.4	126
9	20.4	11.8	1102.9	3	311	9	5.8	4.2	89.4	0.7	248
10	23	11.8	1553.4	3.2	503	10	5.6	4.3	40	0.7	91
11	22.5	12.5	1376.2	3	235						
12	18.6	11.2	975.5	3.1	153						

Vista frontal correspondiente a los frutos de dos genotipos de *Carica papaya* L. colectados. A) Maradol y B) Silvestre.



Anexo III.2. Fotografía en Microscopio Óptico (MO) Vista adaxial y abaxial en hojas de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre. Las flechas blancas indican la ausencia de los estomas en la parte Adaxial de ambos genotipos; por otra parte las flechas blancas indican ubicación de los estomas en la parte Abaxial (40 x).



Anexo III.3. Tabla ANOVA. Análisis estadístico de los datos procesados en el experimento:
Caracterización del punto de estrés por déficit hídrico.

Número de Hojas										
Control						Déficit Hídrico				
Tiempo 0										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	18.5035	1	18.5035	42.87	0	20.4818	1	20.4818	60.05	0
Intra-grupos	9.4965	22	0.431859			7.4965	22	0.34075		
Total	28	23				27.9583	23			
Tiempo 7 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	5.84661	1	5.84661	12.2	0.0024	64.3125	1	64.3125	162.88	0
Intra-grupos	9.10677	19	0.479251			10.9375	26	0.420673		
Total	14.9524	20				75.25	27			
Tiempo 14 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	16.506	1	16.506	20.24	0.0001	48.0058	1	48.0058	176.84	0
Intra-grupos	24.4627	30	0.815425			5.73333	21	0.273016		
Total	40.9687	31				53.7391	22			
Tiempo 21 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	52.6538	1	52.6538	65.71	0	0.516425	1	0.516425	1.02	0.3224
Intra-grupos	19.2308	24	0.801282			13.1879	26	0.50761		
Total	71.8846	25				13.7143	27			
Tiempo 22 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	18.6182	1	18.6182	13.86	0.0016	0.181818	1	0.181818	0.39	0.5383
Intra-grupos	24.1818	18	1.34343			9.27273	20	0.463636		
Total	42.8	19				9.45455	21			
Tiempo 28 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P					
Inter-grupos	8.01818	1	8.01818	23.35	0.0001	1.64835	1	1.64835	9.47	0.005
Intra-grupos	6.18182	18	0.343434			4.36165	25	0.174066		
Total	14.2	19				6	26			

Potencial Hídrico (Ψ_H)										
	Control					Déficit Hídrico				
	Tiempo 0									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.11025	1	0.11025	0.9	0.3706	0.00319114	1	0.00319114	2.25	0.1466
Intra-grupos	0.98004	8	0.122506			0.0340242	24	0.00141768		
Total	1.09029	9				0.0372154	25			
	Tiempo 7 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.0102857	1	0.0102857	0.15	0.7032	0.00319114	1	0.00319114	2.25	0.1466
Intra-grupos	0.81035	12	0.0675292			0.0340242	24	0.00141768		
Total	0.820636	13				0.0372154	25			
	Tiempo 14 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.15282	1	1.15282	20.41	0.0011	0.17004	1	0.17004	6.46	0.0174
Intra-grupos	0.56495	10	0.056495			0.68477	26	0.0263373		
Total	1.71777	11				0.854811	27			
	Tiempo 21 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	2.26305	1	2.26305	306.06	0	1.52935	1	1.52935	308.6	0
Intra-grupos	0.0591524	8	0.00739405			0.113984	23	0.00495582		
Total	2.3222	9				1.64334	24			
	Tiempo 22 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.9838	1	1.9838	6.17	0.0379	0.0882722	1	0.0882722	43.17	0
Intra-grupos	2.57161	8	0.321461			0.0364222	16	0.00227639		
Total	4.55541	9				0.134694	17			
	Tiempo 28 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.04743	1	1.04743	2.17	0.2006	0.00200556	1	0.00200556	0.47	0.501
Intra-grupos	2.41257	5	0.482513			0.0676889	16	0.00423056		
Total	3.46	6				0.0696944	17			

Fotosíntesis (Pn)										
	Control					Déficit Hídrico				
	Tiempo 0									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.20435	1	1.20435	8.37	0.0106	1.46665	1	1.46665	9.19	0.0191
Intra-grupos	2.30165	16	0.143853			1.11737	7	0.159824		
Total	3.506	17				2.58402	8			
	Tiempo 7 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.40114	1	1.40114	16.65	0.0009	10.4626	1	10.4626	111.67	0
Intra-grupos	1.34664	16	0.084165			1.12431	12	0.0936923		
Total	2.74778	17				11.5869	13			
	Tiempo 14 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	3.91813	1	3.91813	56.76	0	1.14702	1	1.14702	158.35	0
Intra-grupos	1.10456	16	0.0690347			0.0941888	13	0.00724376		
Total	5.02269	17				1.24119	14			
	Tiempo 21 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	4.01956	1	4.01956	102.21	0	0.355235	1	0.355235	16.81	0.0013
Intra-grupos	0.62923	16	0.0393269			0.274767	13	0.0211359		
Total	4.64879	17				0.630002	14			
	Tiempo 22 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	3.46547	1	3.46547	99.3	0	0.0481605	1	0.0481605	7.3	0.0243
Intra-grupos	0.558372	16	0.0348982			0.0593748	9	0.0065972		
Total	4.02384	17				0.107535	10			
	Tiempo 28 días									
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	3.8744	1	3.8744	162.65	0	13.8248	1	13.8248	186.78	0
Intra-grupos	0.381117	16	0.0238198			0.962201	13	0.0740155		
Total	4.25552	17				14.787	14			

Fluorescencia de clorofila a (Fv/Fm)										
	Control					Déficit Hídrico				
Tiempo 0										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.00155526	1	0.00155526	0.68	0.4164	8.00735E-06	1	8.00735E-06	0.04	0.8537
Intra-grupos	0.0522333	23	0.00227101			0.00341188	15	0.000227458		
Total	0.0537886	24				0.00341988	16			
Tiempo 7 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.000458693	1	0.000458693	0.11	0.7434	0.00262801	1	0.00262801	3.43	0.0789
Intra-grupos	0.104693	25	0.00418773			0.0153298	20	0.000768492		
Total	0.105152	26				0.0179579	21			
Tiempo 14 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.00415289	1	0.00415289	9.34	0.0051	0.00347374	1	0.00347374	1.77	0.2011
Intra-grupos	0.0115844	26	0.000444783			0.033388	17	0.001984		
Total	0.0157172	27				0.0368618	18			
Tiempo 21 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.000165143	1	0.000165143	0.45	0.5092	2.86364E-06	1	2.86364E-06	0	0.9633
Intra-grupos	0.00958557	26	0.000368676			0.026335	20	0.00131875		
Total	0.00975071	27				0.0263379	21			
Tiempo 22 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.00157084	1	0.00157084	6.54	0.0238	0.000342054	1	0.000342054	1.52	0.2369
Intra-grupos	0.00312166	13	0.00024012			0.00337983	15	0.000225322		
Total	0.0046924	14				0.00372188	16			
Tiempo 28 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.0101922	1	0.0101922	35.89	0	0.00136454	1	0.00136454	2.19	0.1557
Intra-grupos	0.00653175	23	0.000283989			0.011863	19	0.000624367		
Total	0.016724	24				0.0132275	20			

Fuga de electrolitos (%)											
	Control					Déficit Hídrico					
	Tiempo 0										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	
Inter-grupos	175.753	1	175.753	3.25	0.0989	4.31147	1	4.31147	3.35	0.0859	
Intra-grupos	594.949	11	54.0862			20.5856	16	1.2866			
Total	770.702	12				24.8971	17				
	Tiempo 7 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	
Inter-grupos	846.45	1	846.45	17.67	0.0007	147.816	1	147.816	4706.19	0	
Intra-grupos	770.931	16	48.1832			0.502541	16	0.0314088			
Total	1617.38	17				148.318	17				
	Tiempo 14 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	
Inter-grupos	299.327	1	299.327	4.9	0.047	80.341	1	80.341	225.3	0	
Intra-grupos	733.215	12	61.1012			5.70544	16	0.35659			
Total	1032.54	13				86.0464	17				
	Tiempo 21 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	
Inter-grupos	24.1807	1	24.1807	0.44	0.5174	1519.64	1	1519.64	348.39	0	
Intra-grupos	710	13	54.6154			65.4286	15	4.36182			
Total	734.181	14				1585.07	16				
	Tiempo 22 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	
Inter-grupos	214.807	1	214.807	9.78	0.026	417.739	1	417.739	428.75	0	
Intra-grupos	109.788	5	21.9576			15.5889	16	0.974309			
Total	324.595	6				433.328	17				
	Tiempo 28 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	
Inter-grupos	71.8119	1	71.8119	1.22	0.3023	810.688	1	810.688	146.29	0	
Intra-grupos	472.641	8	59.0801			88.6634	16	5.54146			
Total	544.453	9				899.351	17				

Anexo III.4. Tabla ANOVA. Análisis estadístico de los datos procesados en el experimento: Exposición a estrés por déficit hídrico de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre.

Potencial Hídrico (Ψ_H)										
	Control					Déficit Hídrico				
Tiempo 0										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.00105468	1	0.00105468	0.17	0.6838	0.0545415	1	0.0545415	19.5	0.0007
Intra-grupos	0.0980657	16	0.00612911			0.0363602	13	0.00279694		
Total	0.0991204	17				0.0909017	14			
Tiempo 7 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.62401E-05	1	1.62401E-05	0	0.969	0.0163582	1	0.0163582	10.32	0.0074
Intra-grupos	0.144901	14	0.0103501			0.0190131	12	0.00158443		
Total	0.144917	15				0.0353713	13			
Tiempo 14 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.0225556	1	0.0225556	11.86	0.0184	0.280955	1	0.280955	83.63	0
Intra-grupos	0.00951209	5	0.00190242			0.0369546	11	0.00335951		
Total	0.0320677	6				0.31791	12			
Tiempo 15 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.00345629	1	0.00345629	1.58	0.2637	0.0948579	1	0.0948579	9.58	0.0213
Intra-grupos	0.0109088	5	0.00218176			0.0594354	6	0.0099059		
Total	0.0143651	6				0.154293	7			
Tiempo 21 días										
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.0100398	1	0.0100398	1.65	0.2556	0.00880125	1	0.00880125	1.1	0.3098
Intra-grupos	0.0304724	5	0.00609449			0.127992	16	0.0079995		
Total	0.0405122	6				0.136793	17			

Fotosíntesis (Pn)						Conductancia Estomática (gs)					
Tiempo 0						Tiempo 0					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P		Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.0118323	1	0.0118323	0.07	0.7953	Inter-grupos	0.000168667	1	0.000168667	1.87	0.19
Intra-grupos	2.72052	16	0.170033			Intra-grupos	0.00144088	16	9.00549E-05		
Total	2.73235	17				Total	0.00160955	17			
Tiempo 7 días						Tiempo 7 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P		Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.257735	1	0.257735	3.79	0.0684	Inter-grupos	3.65325E-06	1	3.65325E-06	1.71	0.2051
Intra-grupos	1.15713	17	0.0680664			Intra-grupos	4.48545E-05	21	2.13593E-06		
Total	1.41486	18				Total	4.85077E-05	22			
Tiempo 14 días						Tiempo 14 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P		Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.544859	1	0.544859	89.07	0	Inter-grupos	2.23059E-05	1	2.23059E-05	31.17	0
Intra-grupos	0.110111	18	0.00611727			Intra-grupos	1.57421E-05	22	7.16E-07		
Total	0.65497	19				Total	0.000038048	23			
Tiempo 15 días						Tiempo 15 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P		Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	2.02468	1	2.02468	15.15	0.0013	Inter-grupos	0.0211654	1	0.0211654	15.3	0.0007
Intra-grupos	2.13857	16	0.133661			Intra-grupos	0.0331968	24	0.0013832		
Total	4.16325	17				Total	0.0543622	25			
Tiempo 21 días						Tiempo 22 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P		Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	19.0303	1	19.0303	184.22	0	Inter-grupos	0.0200204	1	0.0200204	55.71	0
Intra-grupos	1.65283	16	0.103302			Intra-grupos	0.00826566	23	0.000359377		
Total	20.6832	17				Total	0.028286	24			

CO ₂ Intercelular (Ci)					
Tiempo 0					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	525.981	1	525.981	0.21	0.6566
Intra-grupos	41008	16	2563		
Total	41533.9	17			
Tiempo 7 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	74863.2	1	74863.2	35.86	0
Intra-grupos	35485.1	17	2087.36		
Total	110348	18			
Tiempo 14 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	310393	1	310393	162.3	0
Intra-grupos	30599.2	16	1912.45		
Total	340992	17			
Tiempo 15 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	174681	1	174681	126.94	0
Intra-grupos	23393	17	1376.06		
Total	198074	18			
Tiempo 21 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1786.03	1	1786.03	5.6	0.0309
Intra-grupos	5103.88	16	318.993		
Total	6889.91	17			

Transpiración (E)					
Tiempo 0					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.133558	1	0.133558	0.16	0.6969
Intra-grupos	13.5892	16	0.849327		
Total	13.7228	17			
Tiempo 7 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.00260957	1	0.00260957	3.79	0.0665
Intra-grupos	0.0130855	19	0.000688709		
Total	0.015695	20			
Tiempo 14 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.0101387	1	0.0101387	25.85	0
Intra-grupos	0.00862699	22	0.000392136		
Total	0.0187656	23			
Tiempo 15 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	0.262136	1	0.262136	28.86	0.0001
Intra-grupos	0.145331	16	0.0090832		
Total	0.407467	17			
Tiempo 21 días					
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	1.14408	1	1.14408	2.94	0.1055
Intra-grupos	6.21969	16	0.38873		
Total	7.36377	17			

	Densidad Estomática					Largo de Estoma				
	Déficit Hídrico					Déficit Hídrico				
	Tiempo 0					Tiempo 0				
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	750.012	1	750.012	20.9	0.006	24.04	1	24.04	105.62	0.0005
Intra-grupos	179.417	5	35.8833			0.910467	4	0.227617		
Total	929.429	6				24.9505	5			
	Tiempo 21 días					Tiempo 21 días				
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	450	1	450	11.87	0.0137	22.6409	1	22.6409	57.61	0.0006
Intra-grupos	227.5	6	37.9167			1.96514	5	0.393028		
Total	677.5	7				24.606	6			
	Tiempo 28 días					Tiempo 28 días				
	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P	Suma de Cuadrados	gl	Medias Cuadráticas	F	Valor-P
Inter-grupos	744.048	1	744.048	15.14	0.0115	1.2696	1	1.2696	3.5	0.1348
Intra-grupos	245.667	5	49.1333			1.45173	4	0.362933		
Total	989.714	6				2.72133	5			

Anexo IV.1. Protocolo de Lavado y Deshidratación de muestras biológicas frescas para Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

Lavado de Muestra		
Buffer de fosfatos de sodio 0.2 M pH 7.1		
3 lavados		30 min c/u
Deshidratación		
C ₂ H ₆ O		
30%	2 lavados	60 min c/u
50%	2 lavados	61 min c/u
70%	2 lavados	62 min c/u

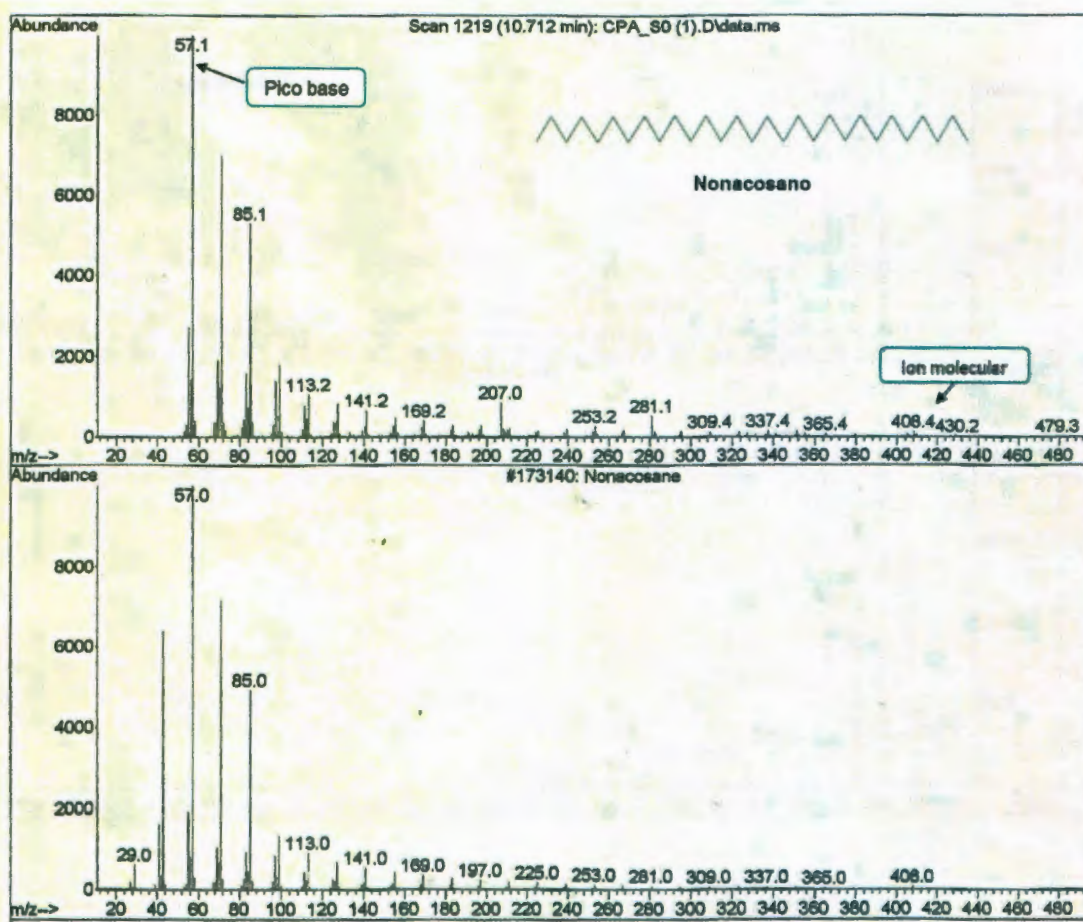
Anexo IV.2. Porcentajes de área bajo la curva de cada uno de los componentes detectados en los cromatogramas obtenidos para cada genotipo a partir del análisis de cromatografía de gases (CG).

Carica papaya genotipo Maradol

Componentes		Tratamientos							
		Control		Día 14		Día 21		Día 28	
No.	RT	% Área	DE	% Área	DE	% Área	DE	% Área	DE
1	9.34	2.19	1.32	0.75	0.11	1.35	0.55	0.93	0.09
2	12.79	17.16	12.86	6.03	2.09	22.12	6.51	10.09	0.32
3	18.12	23.16	24.74	15.53	8.74	31.97	8.80	40.03	20.42
4	19.23	2.65	2.93	0.56	0.23	2.72	1.50	2.13	2.00
5	20.04	2.21	1.63	2.11	1.32	5.32	4.89	3.93	1.09
6	23.2	53.08	43.69	57.93	4.20	29.67	2.83	37.44	1.86

Carica papaya genotipo Silvestre

Componentes		Tratamientos							
		Control		Día 14		Día 21		Día 28	
No.	RT	% Área	DE	% Área	DE	% Área	DE	% Área	DE
1	9.34	9.58	3.56	1.67	0.44	2.82	2.65	5.66	2.65
2	12.79	37.38	4.28	12.92	1.03	27.17	2.93	31.05	11.35
3	18.12	18.25	6.46	5.73	8.56	16.24	1.63	19.53	15.04
4	19.23	1.91	0.81	0.36	0.55	2.33	0.58	2.69	0.58
5	20.04	10.21	9.02	10.65	4.95	11.08	2.01	10.15	2.01
6	23.2	22.68	3.91	68.64	10.42	40.35	10.95	30.89	10.95

Anexo IV.3. Patrones de fragmentación obtenidos por espectrometría de masas.**Library Searched:** C:\Database\NIST05a.L**Quality:** 98**ID:** Nonacosano**Grupo:** Alcanos**RT:** 10.712 min

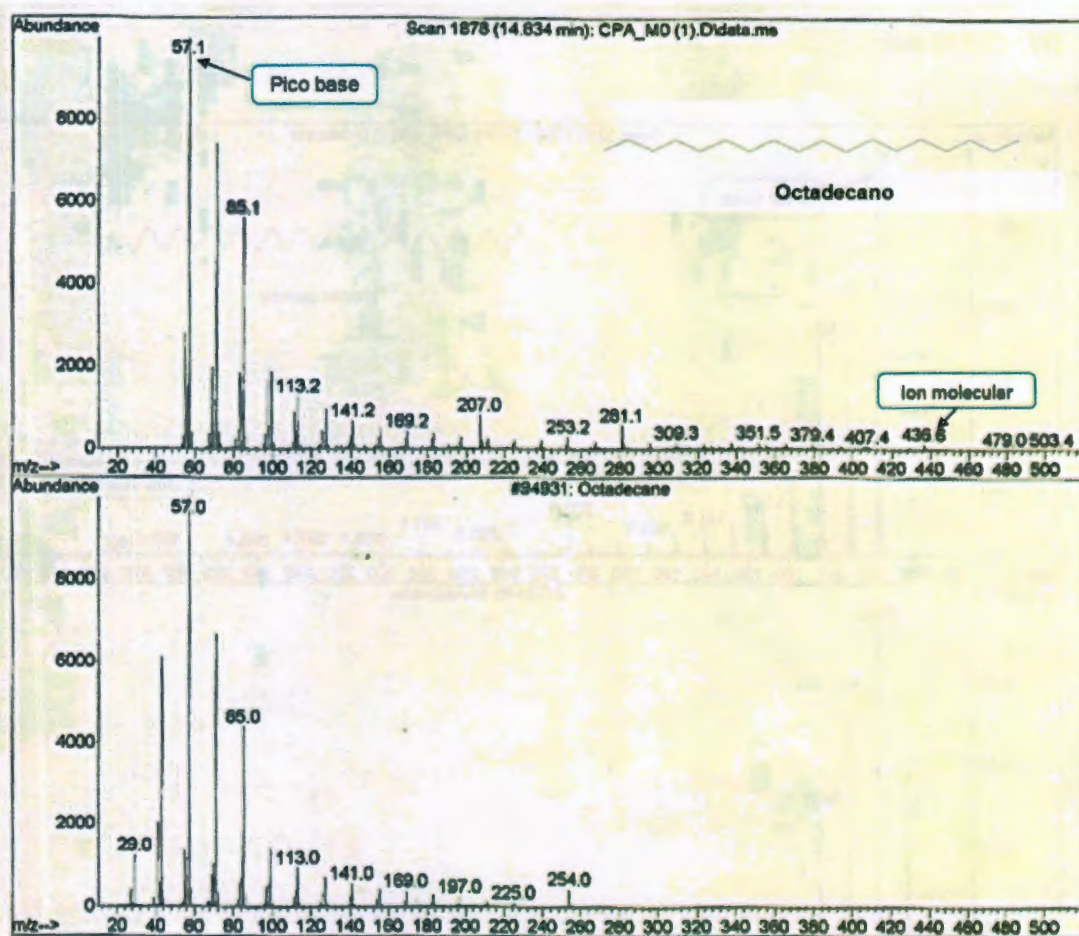
Library Searched: C:\Database\NIST05a.L

Quality: 95

ID: Octadecano

Grupo: Alcanos

RT: 14.834 min



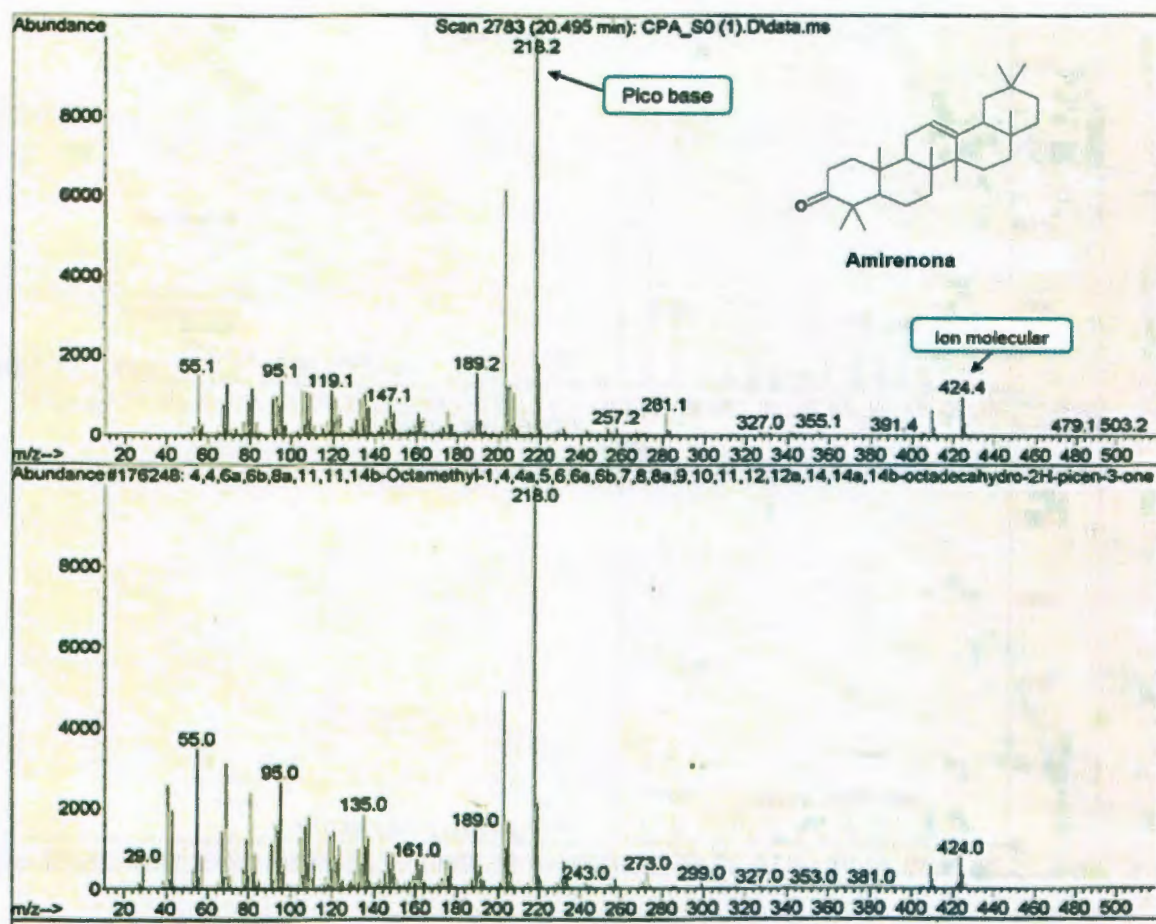
Library Searched: C:\Database\NIST05a.L

Quality: 98

ID: 4,4,6a, 8a,, 11, 11, 14b-Octamethyl-1, 4, 4a, 5, 6, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 14, 14a, 14b-octadecahydro-2H-picen-3-one

Grupo: Triterpenos

RT: 20.495 min



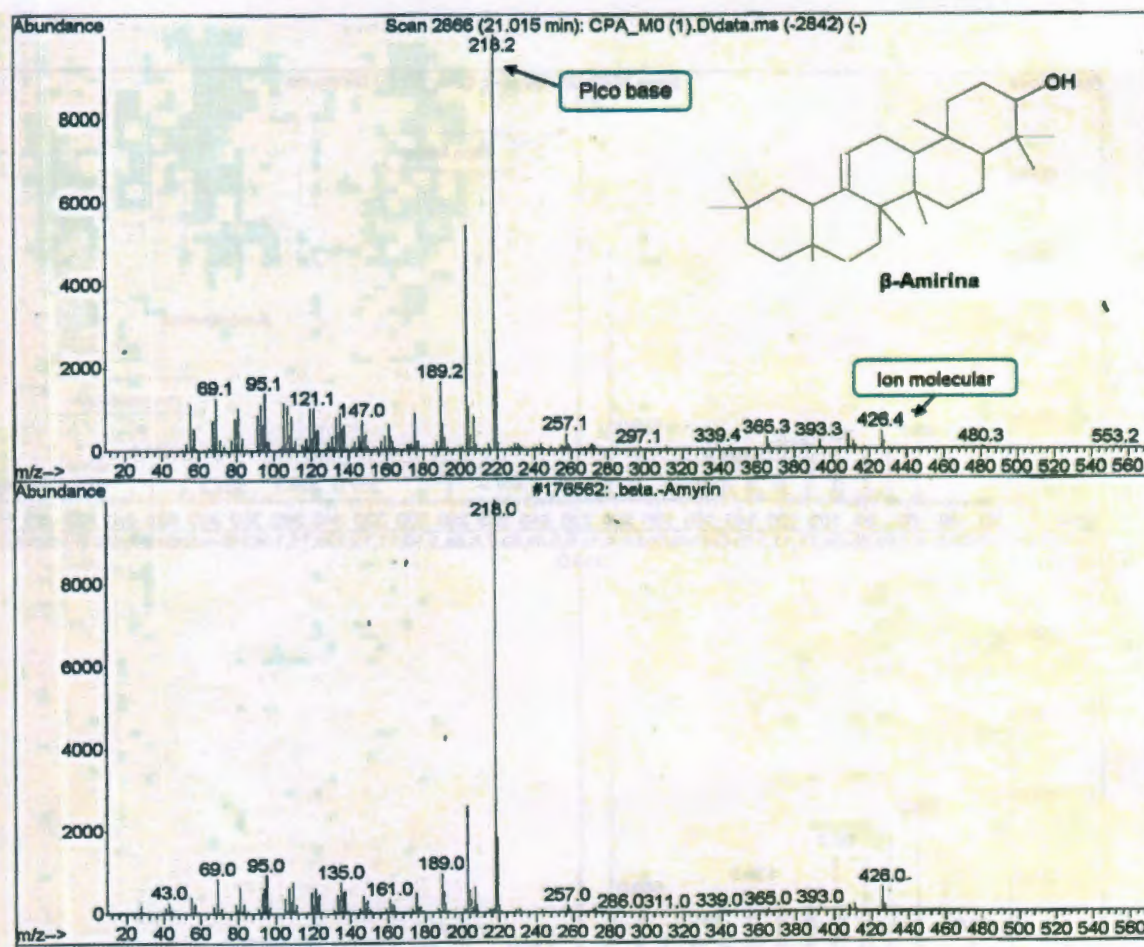
Library Searched: C:\Database\NIST05a.L

Quality: 97

ID: .beta.-Amyrin

Grupo: Triterpenos

RT: 21.015 min



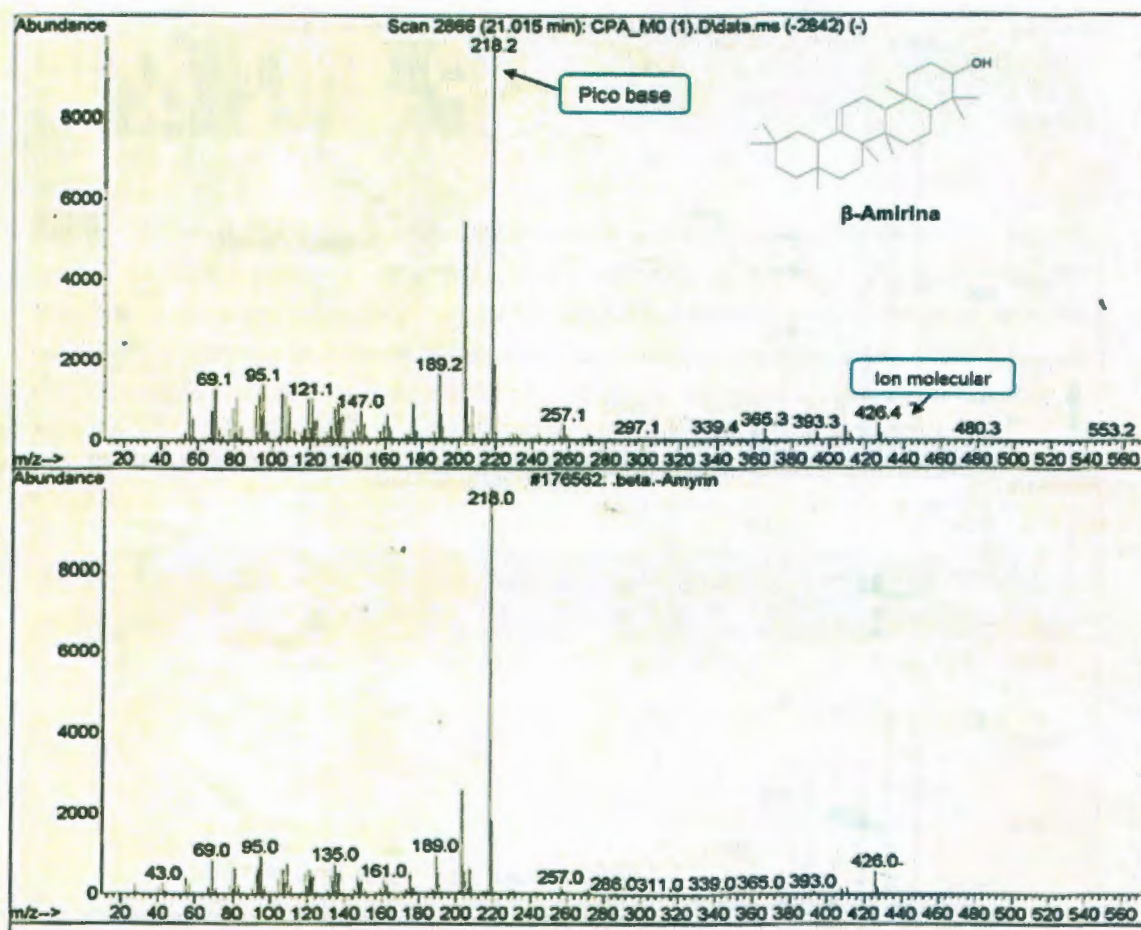
Library Searched: C:\Database\NIST05a.L

Quality: 98

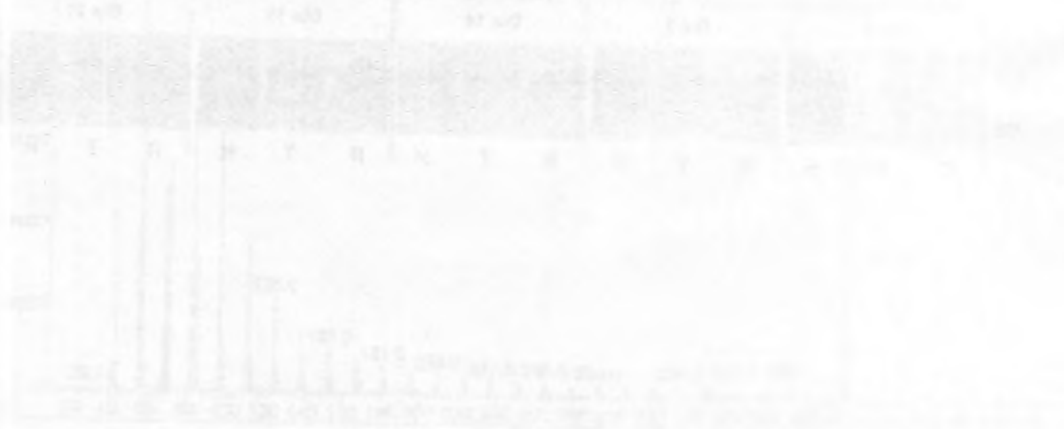
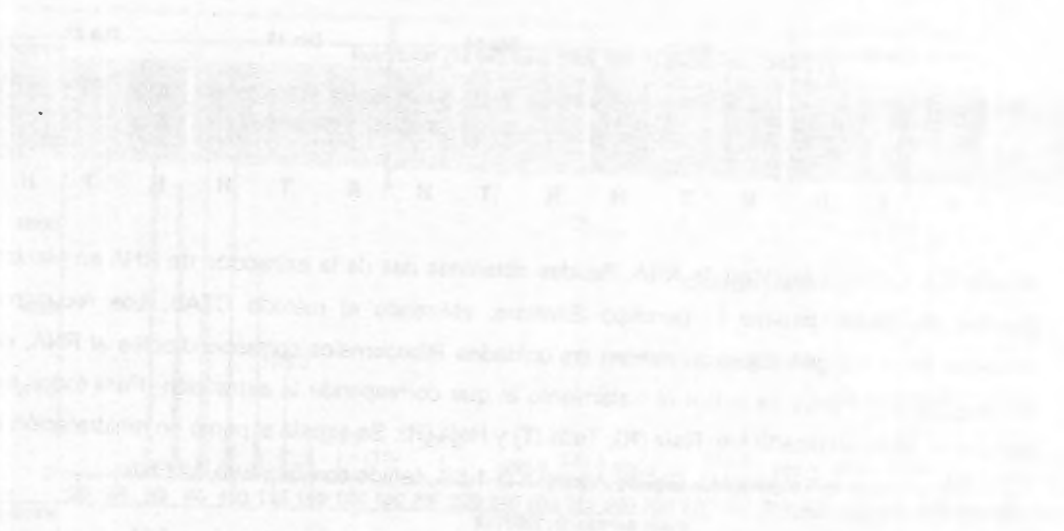
ID: Nonacosane

Grupo: Triterpenos

RT: 22.466 min



El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar la influencia de la temperatura en la actividad enzimática de la amilasa salivaria humana. Para ello se realizaron una serie de ensayos en los que se midió la velocidad de reacción de la amilasa con su sustrato, el almidón, a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos muestran que la actividad enzimática aumenta con la temperatura hasta alcanzar un óptimo a 37°C, después de lo cual disminuye drásticamente. Este comportamiento es característico de las enzimas, ya que su estructura tridimensional, responsable de su actividad catalítica, se ve afectada por cambios de temperatura.



Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

