



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR
INCREMENTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE
EXPOSICIÓN SOBRE LA FISIOLOGÍA Y EXPRESIÓN
DE GENES HSFS EN *Carica papaya* L. cv. Maradol

Tesis que presenta

CHRISTIAN ALCOCER JÁURIGA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México. Julio 2013





CICY

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

DE GENES HSF5 EN CAJETA PAPAYA L. cv. Matador
EXPOSICIÓN SOBRE LA FISIOLÓGIA Y EXPRESIÓN
INCREMENTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE
CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR

Tesis que presenta

CHRISTIAN ALCOCER JÁURIGA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México. Julio 2013





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

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR INCREMENTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA FISIOLÓGÍA Y EXPRESIÓN DE GENES HSFS EN *Carica papaya* L. cv. Maradol”**, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, dentro de la Opción Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.



Mérida, Yucatán, México; Julio de 2013.

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.

CHRISTIAN ALCOCER JÁURIGA

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento, anhelado por todo estudiante cuando ingresa al posgrado, quiero concluir la tesis de maestría expresando mi especial agradecimiento a todos los involucrados en el desarrollo y conclusión de la misma. Deseo agradecer:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número 242983. Gracias por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A The University of California Institute for Mexico and the United States (UC MEXUS) por el apoyo académico y económico al aprobar el proyecto (UC MEXUS CN-10-450) con el nombre: "Characterization of hsf genes from *Carica papaya* L. cv. Maradol in response to heat stress", a través del cual se realizó esta tesis que lleva por nombre "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" y contó con valiosas aportaciones del revisor externo Dr. Eduardo Blumwald, de la University of California (Davis), a quien también quiero agradecerle sus diversos comentarios y correcciones a lo largo de la realización de la misma.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme hacer uso de las instalaciones así como la asesoría en esta tesis del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, titular del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular. Muchas gracias por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Fabio Marcelo Idrovo Espín quien aportó ideas muy valiosas en la elaboración del proyecto, conducción de la tesis y me compartió grandes enseñanzas en las áreas de bioinformática y biología molecular así como su amistad sincera. El fué el primer contacto que tuve en el laboratorio y desde entonces ha vigilado mis primeros experimentos del quehacer científico. En el área molecular también agradezco por estar al pendiente en todo momento de las necesidades del laboratorio a la Dra. Gabriela Fuentes Ortíz y en el área de bioinformática también agradezco al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado por sus observaciones y apoyo.

Al M. en C. Francisco Leonel Espadas y Gil y M. en C. Carlos Roberto Talavera May, técnicos del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, puesto que el desarrollo de la tesis, desde el momento de la germinación de cada semilla de papaya así como su crecimiento, para los diversos experimentos particularmente en el área de fisiología vegetal fue posible gracias a su experiencia, enseñanza en el manejo de los diferentes equipos de medición, dudas resueltas, muchos artículos científicos compartidos así como sus sugerencias para la discusión del capítulo fisiológico. Asimismo quiero agradecer al Ing. Fernando Almícar Contreras Martín, responsable del área de viveros e invernaderos del CICY por facilitarme el uso de las instalaciones así como los diversos insumos bajo su resguardo como los sustratos para la germinación y crecimiento de las plantas, también agradezco sus recomendaciones y asesoría en cuanto riego, fertilización y manejo de plagas durante la realización de la tesis. Gracias a los tres por ayudarme a solucionar más de un problema.

A mis compañeros Benjamín Rodríguez por ayudarme en la parte fisiológica, a Humberto Estrella por su valiosa ayuda en el análisis bioinformático y que junto con Arianna Chan, me apoyaron en el formato final de la tesis. A todos mis compañeros del laboratorio, quienes me hicieron sentir durante mi estancia en el laboratorio como un caminante lleno de compañía, a través del sendero del conocimiento. Gracias a todos por su amistad, por animarme y por ayudarme a resolver muchas dudas juntos.

Al comité evaluador conformado por el Dr. Eduardo Blumwald, Dr. Inocencio Higuera Ciapara, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado por sus revisiones y correcciones pertinentes así como a la Lic Gilma Michell por estar pendiente de todo el proceso de titulación y sus palabras de motivación.

A mi familia, por el apoyo moral y económico, en especial a mi madre por darme la vida con quien he compartido muchas horas, buenas y malas, por haberme ofrecido en todo momento su ayuda y apoyo, sin excepción.

A mis amigos, quienes siempre me brindaron palabras de apoyo y siempre me dieron muy buenos consejos para seguir adelante.

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mi familia, que ha visto mis primeros pasos en mi vida. Porque me ha ayudado a salir adelante, dándome ejemplos de superación, por tenerme mucha comprensión y paciencia; en gran parte gracias a ella, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de la licenciatura y la maestría y el orgullo que sienten por mi, fue lo que me hizo llegar hasta el final.

Dedico este trabajo a mi madre María del Carmen por darme la vida, inculcándome valores, brindarme su cariño, consejos y apoyo incondicional para llegar hasta este momento de mi formación profesional, por ser un ejemplo a través de su fortaleza, constancia, honradez y rectitud que la caracterizan, lo cual ha ayudado a lograr mis objetivos.

A mis tías Asunción, Cristina, Leonor que son, cada una, como una segunda madre, por su motivación constante para ser una mejor persona, por su apoyo incondicional, por estar al pendiente de mi desarrollo intelectual y académico, por compartir momentos significativos conmigo y por estar siempre dispuestas a ayudarme en lo que he requerido en cualquier momento. A mi tío Francisco también por su apoyo paternal y técnico en la elaboración de la cámara térmica, el inicio de todos los experimentos en esta tesis.

A mis abuelos Cristina y Ernesto, que a pesar de nuestra distancia física, siento que están conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ellos, como lo es para mí. A mi hermana Bárbara y a mis primos Francisco y Alejandro, por compartir este crecimiento físico y profesional.

A mi colega Cristina R. Quijano a quien conocí en una ceremonia de mejores promedios (ciclo 2005-2006) en la licenciatura y desde entonces ha sido una gran fuente de admiración, por ser muy estudiosa, responsable y con un carácter tenaz característico de un líder nato, que le ha permitido ser muy exitosa y es lo que me ha inspirado a ser una mejor persona tanto en lo académico como en lo personal. A mi mejor amigo de la licenciatura José María Góngora y a mi mejor amigo de la maestría Aldo B. Contreras, por que su amistad incondicional es una pieza clave en mi desarrollo personal y académico. También a Junior, que me acompañó hasta el final desde que yo era un niño hasta adulto.

INDICE

	Pág
INDICE DE ABREVIATURAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE CUADROS.....	xxi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3

CAPITULO I

I.1. INTRODUCCIÓN.....	5
I.2. ANTECEDENTES.....	7
I.2.1 Cambio climático: aumento de temperatura.....	7
I.2.2 Efecto del aumento de temperatura sobre las plantas.....	9
I.2.3 Importancia económica y como modelo de estudio de <i>Carica papaya</i> L.....	12
I.2.3.1 Características botánicas.....	12
I.2.3.2 Importancia económica.....	13
I.2.3.3 Modelo de estudio para frutos tropicales.....	15
I.2.4 Regulación transcripcional.....	16
I.2.5 Factores de transcripción de choque térmico: Hsfs.....	17
I.2.5.1 Los factores de transcripción Hsfs en animales.....	17
I.2.5.2 Los factores de transcripción Hsfs en plantas.....	20
I.3 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS.....	21
I.3.1 Preguntas de investigación.....	21
I.3.2 Hipótesis.....	21
I.4 OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
I.4 .1 Objetivo General.....	22
I.4.1.1 Objetivos particulares.....	22
I.4.2 Estrategia experimental.....	23
I.5. REFERENCIAS.....	25

CAPITULO II

Análisis *in silico* de la familia heat shock transcription factors en el genoma de *Carica papaya* L. cv. SunUp a partir de *Arabidopsis thaliana*.

II.1 INTRODUCCIÓN	29
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
II.2.1 Búsqueda de secuencias hsfs en <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
II.2.2 Aislamiento <i>in silico</i> de genes tipo hsfs en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.....	34
II.2.3 Selección de secuencias homólogas tipo hsf en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp	34
II.2.4 Predicción del marco de lectura abierto (ORF).....	34
II.2.5 Alineamiento de secuencias proteicas e identificación de dominios conservados en <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.....	35
II.2.6 Análisis filogenético entre <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L cv SunUp...	35
II.2.7 Diseño de oligonucleótidos de genes hsfs en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.....	36
II.3 RESULTADOS	36
II.3.1 Obtención de secuencias hsfs en <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
II.3.2 Aislamiento <i>in silico</i> de genes tipo hsfs en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.....	37
II.3.3 Selección de secuencias homólogas tipo hsf en <i>Carica papaya</i> L cv SunUp...	38
II.3.4 Alineamiento de secuencias proteicas e identificación de dominios conservados en <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.....	39
II.3.5 Análisis filogenético entre <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L. cv SunUp..	42
II.3.6 Diseño de oligonucleótidos de genes hsfs en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.....	48
II.4. DISCUSIÓN	49
II.5. CONCLUSIONES	55
II.6. REFERENCIAS	57

CAPITULO III

Caracterización del efecto por incremento de temperatura y tiempo de exposición sobre la fisiología de plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol

III.1 INTRODUCCIÓN	61
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS	63
III.2.1 Diseño de la cámara térmica.....	63
III.2.2 Material vegetal.....	64

III.2.2.1 Germinación y edad fisiológica.....	64
III.2.3 Experimentos.....	66
III.2.3.1 Determinación del punto de estrés térmico.....	66
III.2.3.2 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación.....	67
III.2.3.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación.....	68
III.2.4 Análisis fisiológico.....	69
III.2.4.1 Fluorescencia de clorofila a.....	69
III.2.4.2 Conductancia estomática.....	69
III.2.4.3 Fuga de iones.....	69
III.2.4.4 Contenido relativo de agua.....	70
III.2.4.5 Determinación del contenido de pigmentos.....	70
III.3 RESULTADOS.....	70
III.3.1 Diseño de la cámara térmica.....	70
III.3.2 Determinación del punto de estrés térmico.....	71
III.3.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación.....	79
III.3.4 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación....	82
III.4 DISCUSIÓN.....	86
III.4.1 Determinación del punto de estrés térmico.....	86
III.4.2 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación.....	93
III.4.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación.....	96
III.5 CONCLUSIONES.....	102
III.6 REFERENCIAS.....	104

CAPITULO IV

Expresión basal y en respuesta al incremento de temperatura y tiempo de exposición de genes Cphsfs en *Carica papaya* L. cv. Maradol

IV.1 INTRODUCCIÓN	111
IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	115
IV.2.1 Material vegetal	115
IV.2.1.1 Colecta de tejido vegetal adulto	115
IV.2.1.2 Germinación y edad fisiológica	116

IV.2.2 Experimentos	117
IV.2.2.1 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación....	117
IV.2.2.2 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación..	117
IV.2.3 Análisis molecular.....	118
IV.2.3.1 Análisis de calidad de ARN.....	118
IV.2.3.2 Extracción de ARN.....	118
IV.2.3.2 Síntesis de ADNc y amplificación de genes a partir de ADNc.....	118
IV.2.3.3 Extensión de genes.....	119
IV.3 RESULTADOS	119
IV.3.1 Análisis de calidad de ARN.....	119
IV.3.2 Expresión basal en plantas adultas.....	121
IV.3.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación.....	122
IV.3.4 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación.....	126
IV.4 DISCUSIÓN.....	132
IV.4.1 Clase A	132
IV.4.2 Clase B	138
IV.4.3 Clase C.....	142
IV.5 CONCLUSIONES	143
IV.5.1 Expresión basal de genes tipo Cphsfs	143
IV.5.2 Expresión de genes tipo Cphsfs en respuesta a calor.....	143
IV.6 REFERENCIAS	147

CAPITULO V

V.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	151
V.1.1 Análisis bioinformático y elección de genes hsfs para el estudio de su expresión	151
V.1.1 Efecto sobre la fisiología y expresión de genes hsfs en <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol por incremento de temperatura y tiempo de exposición	156
V.2. CONCLUSIÓN GENERAL.....	163
V.3. PERSPECTIVAS.....	164
V.4. REFERENCIAS.....	165

INDICE DE ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AHA*	Aromatic, Hydrophobic and acidic
ARN	Ácido ribonucleico
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BioEdit*	BioEdit Secuence Alignment Editor
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CDPK	Calcium dependent protein kinase
cm	Centímetro
CO₂	Bióxido de carbono
Cp	<i>Carica papaya</i> L.
CTAB*	Cetyltrimethyl ammonium bromide
CTAD*	C-Terminal Activation Domain
cv	Cultivar
D	Aspartato
DBD*	Dna-Binding Domain
dNTPs*	Deoxyribonucleotide triphosphates
dTT*	Dithiothreitol
E	Ácido glutámico
Fd	Ferredoxina
F	Fenilalanina
F₀	Fluorescencia mínima de la clorofila
F_m	Fluorescencia máxima de la clorofila
FS II	Fotosistema II
Fv/Fm	Relación entre la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y F_m
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
g_s	Conductancia estomática
h	Hora

Índice de Abreviaturas

HAMK*	Heat shock activated MAPK
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HR*	Hydrophobic regions
HSE*	Heat shock element
hsf*	Gen "heat shock factor/ heat stress transcription factor"
Hsf*	Proteína "heat shock factor/ heat stress transcription factor"
HSK*	Histidine kinase
hsp*	Gen "heat shock protein"
Hsp*	Proteína "heat shock protein"
I	Isoleucina
IPCC*	Intergovernmental Panel on Climate Change
K	Lisina
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
L	Leucina, cuando se trate de aminoácidos
MAPK*	Mitogen activated protein kinases;
mg	Miligramo
mil ton	Miles de toneladas
min	Minuto
ml	Mililitro
μL	Microlitro
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MM	Marcador de peso molecular
mM	Milimolar
Mpb	Millones de pares de bases
N*	North
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NCBI*	National Center for Biotechnology Information
NES*	Nuclear Export Signal
ng	Nanogramo

NLS*	Nuclear Localization Signal
OD*	Oligomerization Domain
ORF*	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PEPc	Fosfoenol piruvato carboxilasa
p/v	Peso a volúmen
R	Arginina
RACE*	Rapid Amplification of cDNA Ends
ROS*	Reactive oxygen species
RuBisCO	Ribulosa-1, 5 -bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
seg	Segundo
TAE*	Tris-Acetate-EDTA
TBP*	TATA-binding protein
TCMA	Tasa de Crecimiento Media Anual
Tm	Temperatura de alineamiento
ton	Tonelada
V	Voltio
V	Valina, cuando se trate de aminoácidos
W*	Western
W	Triptófano, cuando se trate de aminoácidos
WGS*	Whole-Genome Shotgun
Y	Tirosina

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

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
I.1 Temperatura promedio de la década del 2000 al 2009. Este mapa fue generado por GISS/NASA (2010) a partir de las temperaturas promedio de un período de 10 años (2000-2009) considerado la década más cálida desde que se empezó a registrar la temperatura mundial, a mediados del siglo XIX, respecto a la media (0.51 °C) del período de 1951-1980 un período con poco incremento (0.17 °C por cada década). Los mayores aumentos de temperatura se registraron en el Ártico y la Península Antártica	7
I.2 Regulación de la transcripción de genes hsp por factores de transcripción Hsfs. a) en condiciones normales los factores de transcripción de choque térmico (Hsfs) se encuentran como monómeros en el citoplasma. b) bajo condiciones de estrés, los factores de transcripción Hsfs forman trímeros y se activan. c) el trímero es importado desde el citoplasma hacia el núcleo donde se unen a la zona promotora HSE de genes hsp y d) ocurre la transcripción de genes Hsp	19
I.3 Control de la síntesis de ARNm durante la transcripción de hsp70. a) la ARN polimerasa II se detiene después de sintetizar alrededor de 25 nucleótidos del transcripto a medida que CHBF (constitutive HSE binding factors) se une al HSE. b) después de un choque térmico, los factores de transcripción Hsfs son convertidos desde una forma inactiva hacia una forma activa que pueda unirse al ADN. c) unión de factores de transcripción de choque térmico Hsfs trimerizados (activados) hacia el elemento regulatorio de choque térmico (HSE) del promotor del gen hsp70, lo que libera a la ARN polimerasa II, conduciendo hacia una rápida transcripción del gene hsp70	19
I.4 Diagrama metodológico. Este estudio, incluyó cuatro etapas principales (rectángulos azules) y varias actividades secundarias (rectángulos	

	verdes). La etapa 1 consistió en la búsqueda de secuencias en diferentes bases de datos para el análisis bioinformático de la etapa 2 . En la etapa 3 se realizó el análisis fisiológico a partir de plantas germinadas de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a tratamientos térmicos en tres experimentos (a , b y c). En la etapa 4 se realizó el análisis molecular, que consistió en el estudio de la expresión basal a partir de tejido vegetal de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol previamente colectado en una plantación comercial, así como también se incluyó el estudio de la expresión de genes hsf en respuesta a calor a partir de plantas jóvenes germinadas de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol y expuestas en los experimentos b y c	23
II.1	Factores de transcripción del choque térmico Hsfs en <i>A. thaliana</i> . Se ejemplifica cada una de las tres clases existentes en <i>A. thaliana</i> : A, B y C, así como los dominios característicos de cada clase. 1) Se hace referencia a un miembro de la clase A. 2) Corresponde a una miembro de la clase B y 3) es el único miembro reportado de la clase C en <i>A. thaliana</i> (Baniwal, <i>et al.</i> , 2004)..	32
II.2	Alineamiento con el programa BioEdit de secuencias proteicas Hsfs de <i>A. thaliana</i> y secuencias proteicas Hsfs predichas en <i>C. papaya</i> L. cv SunUp. En color negro se muestra el alineamiento de aminoácidos idénticos, en gris similares y blanco divergentes. Los dominios se señalan en morado (DBD), en verde (OD), rojo (NLS), naranja (CTAD) y amarillo (NES)	42
II.3	Árbol filogenético de secuencias proteicas Hsfs en <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtHsf). Se obtuvo a partir de la prueba de Maximum Likelihood y el mejor modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT). La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva. Se utilizó una distribución gamma discreta con categoría =5 para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios	43

II.4	<p>Árbol filogenético entre <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L. cv. <i>SunUp</i>. Se muestra la relación existente entre las 21 secuencias proteicas AtHsfs (círculos verdes) y las 18 secuencias proteicas predichas CpHsfs (círculos rojos). El árbol se obtuvo a partir de la prueba de Maximum Likelihood y el mejor modelo Jones-Taylor-Thomton (JTT). La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva. Se utilizó una distribución gamma discreta con categoría =5 para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios. La línea continua de color azul indica dos clados principales mientras que la línea discontinua en color morado indica subclados. Los asteriscos en color naranja indican las secuencias proteicas Hsfs, de las cuales se evaluó la expresión de sus genes hsfs en esta tesis, en el capítulo IV.</p>	47
III.1	<p>Cámara térmica. a) El diseño de la cámara térmica fue rectangular y el material consistió en cristal de 2 mm de espesor, en la parte superior y por fuera se colocó el termostato mientras que en la parte interior se colocó la resistencia eléctrica. b) Se muestra el termostato con un rango de temperatura de -10 °C a 50 °C ± 2 °C. c) La resistencia eléctrica se encontró dentro de una caja de aluminio con la intención de darle dirección al aire caliente, en un extremo se colocó el ventilador mientras que el otro extremo permaneció abierto para la salida del aire.....</p>	64
III.2	<p>Proceso de germinación y aclimatación de las plantas de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol. a) Invernadero en el CICY. b) Caja con malla de protección dentro del invernadero. c) Plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. cv Maradol a los 65 días, en el inicio del período de aclimatación dentro del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular</p>	65
III.3	<p>Mediciones de verificación realizadas en la cámara térmica. La cámara se colocó dentro del cuarto de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, cuya temperatura fue de 25 °C ± 1 °C día/noche. n= 12 por</p>	

	cada punto de medición. Media \pm DE	71
III.4	Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 1 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (1 h de exposición), 1 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes temperaturas: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja).	72
III.5	Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 2 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (2 h de exposición), 2 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes tratamientos: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja)	73
III.6	Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 4 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la	

- exposición al calor (4 h de exposición), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes tratamientos: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja) 74
- III.7** Plantas jóvenes de *Carica papaya* L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 4 h. **a)** Planta mantenida a 25 °C (Control). **b)** planta al término de 4 h de exposición a 50 °C, **c)** planta vista a las 4 h de recuperación, **d)** planta después de 24 h de recuperación y **e)** planta vista después de 1 semana de recuperación, se puede observar la abscisión de hojas 75
- III.8** Abscisión de hojas en plantas jóvenes de *Carica papaya* L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 4 h. **a)** Planta mantenida a 25 °C (control). **b)** planta expuesta a 50 °C durante 4 h vista después de 10 días de recuperación, puede observarse que las hojas de mayor edad se han caído (75 %), la planta aún sigue viva y con nuevos brotes (ápice o zona apical). **c)** Gráfica correspondiente al conteo de hojas en plantas expuestas durante 4 h a 30 °C, 40 °C y 50 °C, desde el inicio del tratamiento hasta 10 días de recuperación. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señala la mayor temperatura en línea roja (50 °C) 76
- III.9** Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 8 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (**a**) como la conductancia (**b**) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (8 h de exposición), 1 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de

	recuperación en tres diferentes tratamientos: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media ± DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja)	77
III.10	Plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 3 diferentes temperaturas durante 8 h. a) Planta mantenida a 25 °C. Las figuras b) , c) y d) corresponden a las plantas al término de las 8 h de exposición a 30 °C 40 °C y 50 °C respectivamente. e) planta mantenida a 25 °C después de 1 semana. f) , g) y h) son las plantas que se expusieron a 30 °C 40 °C y 50 °C respectivamente durante 8 h, vistas después de 1 semana de recuperación (regresadas a 25 °C)	78
III.11	Plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 8 horas. a) Plantas jóvenes vistas a las dos semanas de recuperación, el 100% se murieron, puede observarse que las plantas muertas conservaron las hojas, totalmente deshidratadas al igual que el resto de la planta. b) la raíz principal presentó pudrición y ausencia de raíces secundarias	79
III.12	Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g _s) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media ± DE	80
III.13	Fuga de iones (%) y Contenido relativo de agua (%) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Tanto	

	el porcentaje de Fuga de iones (a) como el porcentaje del Contenido relativo de agua (b) fueron medidos a partir de discos de hoja tomados con sacabocado N° 9 (1 cm diámetro) en el estrato medio de las plantas al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media ± DE	80
III.14	Clorofilas en 4 tejidos de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Los pigmentos evaluados consistieron en clorofila total, clorofila a y clorofila b en hoja (a), peciolo (b), tallo (c) y raíz (d). Los tejidos se colectaron en el estrato medio de las plantas al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media ± DE	81
III.15	Carotenoides en 4 tejidos de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Los carotenoides fueron evaluados en hoja, peciolo, tallo y raíz. Los tejidos se colectaron en el estrato medio de las plantas al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media ± DE	82
III.16	Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g _s) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas durante 4 h a 50 °C. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación) y 1 semana de recuperación. Las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5	

	réplicas. Media \pm DE	83
III.17	Fuga de iones (%) y Contenido relativo de agua (%) en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas durante 4 h a 50 °C. Tanto el porcentaje de Fuga de iones (a) como el porcentaje del Contenido relativo de gua (b) fueron medidos a partir de discos de hoja tomados con sacabocado N° 9 (1 cm diámetro) en el estrato medio de las plantas antes del experimento (tiempo cero), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación) y 1 semana de recuperación. Las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE	84
III.18	Medición de pigmentos en 4 tejidos de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas durante 4 h a 50 °C. Los pigmentos evaluados consistieron en clorofila total, clorofila a, clorofila b y carotenoides, en hoja (a) , peciolo (b) , tallo (c) y raíz (d) . Las colectas de tejido fueron en el estrato medio de las plantas antes del experimento (tiempo cero), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación) y 1 semana de recuperación. En el caso de la raíz, la colecta consistió en la parte central, con previa eliminación del sustrato. Las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE	85
IV.1	Mecanismos de respuesta al estrés por calor en plantas. Esquema propuesto por Sung (<i>et al.</i> , 2003) modificado por Weng y Lai (2005), donde puede observarse a los factores de transcripción Hsfs como los reguladores centrales de los genes hsps. También son los componentes terminales de una cadena de transducción de señales que media la activación de los genes sensibles al calor y un gran número de factores que causan estrés oxidativo	112

- IV.2** Expresión basal de 6 genes hsf en diferentes tejidos de plantas adultas de *C. papaya* L. cv. Maradol. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . En una plantación comercial se colectaron diferentes tejidos de plantas adultas éstos se indican en los recuadros de la parte superior como sigue: H) hoja, P) peciolo, Pe) pétalo, Fi) fruto inmaduro, Fm) fruto maduro, T) tallo y R) raíz. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb; el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus 121
- IV.3** Expresión de 6 genes hsf en hoja de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus 123
- IV.4** Expresión de 6 genes hsf en peciolo de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus 124
- IV.5** Expresión de 6 genes hsf en tallo de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los

	recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus	125
IV.6	Expresión de 6 genes hsf en raíz de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus	126
IV.7	Expresión de 6 genes hsf en hoja de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus	127
IV.8	Expresión de 6 genes hsf en peciolo de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus	129

IV.9	<p>Expresión de 6 genes hsf en tallo de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus</p>	130
IV.10	<p>Expresión de 6 genes hsf en raíz de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus</p>	131
V.1	<p>Integración del análisis fisiológico y molecular en hoja de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol. En la parte superior se encuentran los parámetros fisiológicos con sus respectivas unidades y escalas mientras que en la parte inferior se encuentran los diferentes patrones de expresión de genes hsf, indicando el nombre de cada gen hsf, el fragmento esperado en pb y el marcador de peso molecular (MM).....</p>	158

INDICE DE CUADROS

	Pág.
I.1 Tipos de flor que existen en <i>Carica papaya</i> L	12
I.2 Clasificación taxonómica de <i>Carica papaya</i> L	13
II.1 Secuencias nucleotídicas hsfs deA. <i>Thaliana</i> en 3 bases de datos	37
II.2 Secuencias de nucleótidos hsfs con la mayor homología encontradas en el genoma de <i>C. papaya</i> L. cv. SunUp	38
II.3 Matriz de distancia entre las secuencias proteicas Hsf de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp.	44
II.4 Asignación del nombre de las 18 secuencias proteicas en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp, ordenadas por clase	45
II.5 Oligonucleótidos diseñados para los 6 genes hsfs	48
III.1 Grupos y subgrupos formados con plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol para la determinación del punto de estés térmico, evaluando distintas temperaturas y diferentes tiempos de exposición	66
IV.1 Calidad del ARN, en diferentes tejidos de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas (30 °C, 40 °C y 50 °C) durante 1 hora, sin recuperación.	120
IV.2 Calidad del ARN, en 4 tejidos de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 4 h.. . . .	120

RESUMEN

El cambio climático, en particular el aumento en la temperatura se presenta como una amenaza real al desempeño fisiológico y rendimientos de varios cultivos en lugares tropicales y subtropicales (NCDC, 2011; GISS, 2010). La respuesta al choque térmico está relacionada con los genes heat shock transcription factors (hsfs) los cuales parecen ser los componentes centrales de tal respuesta, a través de las proteínas (Hsfs) para las cuales codifican; éstas actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de genes sensibles al calor y aquellos relacionados al estrés oxidativo (Hewezi *et al.*, 2008).

En esta tesis se reporta por primera vez la caracterización *in silico*, identificación y relación filogenética de la familia completa heat shock transcription factors en papaya (*Carica papaya* L. cv. SunUp). Se aislaron *in silico* 18 secuencias nucleotídicas hsfs dentro del genoma secuenciado de *C. papaya* L. cv. SunUp (Cphsfs) homólogas a *A. thaliana* (Athfs). A partir de éstas se predijeron 18 proteínas Hsfs en *C. papaya* L. cv. SunUp (CpHsfs) y se alinearon con las secuencias de aminoácidos de *A thaliana* (AtHsfs) encontrándose dominios conservados y se estableció la relación filogenética.

Para estudiar el efecto del incremento de la temperatura y tiempo de exposición sobre la fisiología y expresión de 6 genes hsfs en plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol, se determinó el punto de estrés térmico (estrés severo). En base a esto se evaluaron tres etapas: 1) estrés moderado, 2) estrés severo y 3) post estrés (recuperación). Fisiológicamente, en el punto de estrés térmico se registró la mayor afectación como disminución en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, conductancia estomática, contenido total de clorofilas, contenido relativo de agua y aumento en el contenido de carotenoides y en la fuga de iones, estos dos últimos, son buenos indicadores de daño membranal y estrés oxidativo.

Las afectaciones fisiológicas fueron acompañadas por cambios de expresión en los 6 genes hsfs (RT-PCR semi cuantitativa), sugiriendo un importante papel en el sensado del aumento de temperatura y estrés oxidativo, en diferentes etapas del estrés térmico. En las tres etapas, el gen CphsfA2 mantuvo un aumento de expresión mientras que en CphsfA1b, ésta disminuyó. Los genes CphsfA1a CphsfB2b y CphsfC1 aumentaron su expresión en post estrés, evidenciado su participación en la etapa de recuperación mientras que CphsfB1 aumentó en el estrés severo pero no en la etapa posterior a este.

ABSTRACT

Climate change, in particular the increase in temperature is a real threat to physiological performance and yields of various tropical and subtropical crops (NCDC, 2011; GISS, 2010). The heat shock response is related to heat shock transcription factors genes (hsfs) which seem to be the core components of such a response, via the proteins (Hsfs) which they encode for, they act as transcription factors regulating the gene expression sensitive to heat and those associated with oxidative stress (Hewezi et al., 2008).

We reported, in the present thesis for the first time, the *in silico* characterization, identification and phylogenetic relationships of the entire family of heat shock transcription factors in papaya (*Carica papaya* L. cv. SunUp). We isolated *in silico* 18 nucleotide sequences hsfs-like within the sequenced genome *C. papaya* L. cv. SunUp (Cphsfs), homologous to *A. thaliana* (Athfs). From those, 18 proteins were predicted (CpHsfs) and they were aligned with the amino acid sequences of *A. thaliana* (AtHsfs), finding highly conserved domains and the papaya proteins grouped in the same clades as those of *A. thaliana* in phylogenetic trees.

To study the effect of heat stress on the physiology and expression of 6 hsfs genes in *C. papaya* L. cv. Maradol it was determined the stress point (temperature and exposure time) in which the plants showed severe stress. On this basis, we evaluated three stages: 1) moderate stress, 2) severe stress and 3) post stress (recovery). At the point of thermal stress, most of the physiological parameters suffered severe reduction (decreased photochemical efficiency of photosystem II, reduced stomatal conductance, reduced total chlorophylls content as well as reduced relative water content, but accompanied by an increased carotenoids content and ion leakage, which are two good indicators of membrane damage and oxidative stress.

Those physiological effects were accompanied by changes in gene expression of the 6 hsfs (semi-quantitative RT-PCR), suggesting an important role in the sensing of the temperature rise and probably to an increased oxidative stress. In all three stress phases, CphsfA2 gene expression increased with temperature while the expression of CphsfA1b decreased. The increased expression of CphsfA1a, CphsfC1 and CphsfB2b in the post-stress stage, demonstrated their involvement in mechanisms of heat recovery while the expression of CphsfB1 only increased during the severe stress stage but not during the post-stress stage.

CAPITULO I

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR INCREMENTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA FISIOLOGÍA Y EXPRESIÓN DE GENES HSFS EN *Carica papaya* L. cv Maradol

I.1 INTRODUCCIÓN

El cambio climático como resultado de la creciente acumulación de los gases de efecto invernadero, amenaza con el derretimiento del hielo polar, aumento del nivel del mar, la acidificación de los océanos en los ecosistemas marinos, riesgos presentados por la expansión del cinturón tropical para la agricultura mundial y el abastecimiento de agua, sin embargo el aumento de temperatura se perfila a ser el principal problema para los cultivos mundiales y la comprensión de dicho aumento en los sistemas de la Tierra, se debe a la atención prestada sobre los impactos regionales, así como a los resultados de los monitoreos internacionales (McMullen y Hayden, 2009).

La estimación del efecto del calentamiento global a la economía mundial señala que el aumento de 1 °C más en la temperatura promedio, reduciría el ingreso económico mundial entre un 2.7 y 4.2 % (Horowitz, 2009). Tan y Shibasaki (2003) determinaron que el calentamiento global será particularmente dañino para la agricultura mundial, esto en base al uso de modelos matemáticos que integraban datos hidrológicos, climatológicos, edafológicos, nutrición vegetal, ambientales y económicos, utilizando al globo como área total de estudio. De las estimaciones, se observó que en el período comprendido entre los años 2000 a 2050, casi el 60 % de los países podrían reducir el rendimiento en la producción de maíz y trigo, 61 % en la producción de soya, 53 % en la producción de arroz; estos cuatro cultivos representan hasta el 70 % de la producción mundial. Los continentes más afectados serían África y Sudamérica, con mayor énfasis en las zonas del cinturón tropical y zonas cercanas a éste.

A nivel mundial existen alrededor de 13 especies vegetales comerciales mejoradas por ingeniería genética como el maíz, soya, alfalfa, algodón o papaya y son innumerables los trabajos en especies modelo como *arabidopsis*, tabaco, tomate o arroz que demuestran el inmenso potencial y utilidad de las plantas genéticamente modificadas (Battisti y Naylor, 2009).

Como estrategia biotecnológica en respuesta al estrés tanto biótico como abiótico, es usual caracterizar genes que codifican para factores transcripcionales. Durante eventos estresantes, esencialmente por altas temperaturas se ha observado la activación de determinados genes de choque térmico colectivamente conocidos como heat shock factors o heat stress transcription factors (genes hsfs) que codifican para proteínas del mismo nombre (factores de transcripción Hsfs), estos últimos promueven la expresión de genes codificantes para chaperonas, cuya actividad se encamina a contrarrestar los efectos negativos de la temperatura elevada (Kotak *et al.*, 2007; Busch *et al.*, 2005).

Mucha de la literatura científica sobre estrés térmico es molecular y hace referencia a bajas temperaturas, por lo que surge la necesidad de realizar estudios de estrés por temperaturas altas en un contexto fisiológico y molecular, en base a herramientas biotecnológicas, encaminados primero a conocer la respuesta fisiológica, caracterizar genes encargados de contrarrestar el estrés térmico y finalmente la obtención de plantas resistentes a temperaturas altas. Según Ming (*et al.*, 2008) la papaya (*Carica papaya* L.) es una de las frutas tropicales más importantes con carácter comercial, es la primera fruta modificada genéticamente (resistencia al virus de la mancha anular) y su genoma ha sido secuenciado en su totalidad (*Carica papaya* L. cv. SunUp) y debido a que es un cultivo relativamente rápido con un tamaño de genoma pequeño, la papaya potencialmente puede ser un modelo de estudios moleculares para frutos tropicales.

Este trabajo pretende complementar con estudios de respuesta fisiológica, los trabajos sobre caracterización de genes hsfs en plantas y generar conocimiento nuevo en *Carica papaya* L. cv. Maradol con fines biotecnológicos, debido a que los estudios moleculares en variedades de este cultivar se centran actualmente en la generación de plantas transgénicas de papaya resistentes a *Colletotrichum gloesporoides*, a pesticidas, y a la generación de plantas acumuladoras de metales pesados (AGOGTR, 2008).

I.2 ANTECEDENTES

I.2.1 Cambio climático: aumento de temperatura

Entre los años 1950 y 2000 la temperatura media de la superficie de la tierra aumentó desde 13.8 °C a 14.5 °C; la cubierta de nieve del hemisferio norte bajó en ese mismo periodo desde 38.5 millones a 35.5 millones de km² y el nivel medio del mar subió 6 cm (Montoya-Aguilar, 2009). La temperatura global promedio del aire en la superficie continúa una tendencia ascendente; el período comprendido entre 2000 al 2009 constituye la década más cálida desde que se empezó a registrar la temperatura mundial, a mediados del siglo XIX (figura I.1). El año 2005 es el más cálido registrado mientras que el año 2009 resultó el segundo, junto a un grupo integrado por los años 1998, 2002, 2003, 2006 y 2007, completando a su vez la década más cálida (NCDC, 2011; GISS, 2010).

En 2009, los efectos de enfriamiento atribuidos al ciclo de la Niña se vieron debilitados mientras que se desarrollaba el sistema del Niño, en el este del Pacífico (NCDC, 2011; McMullen y Hayden, 2009). El fenómeno de aumento de temperatura ha llegado al punto de que ya se han abierto, por breves periodos, los pasos marítimos entre el Atlántico, el Océano Ártico y el Pacífico (Montoya-Aguilar, 2009).

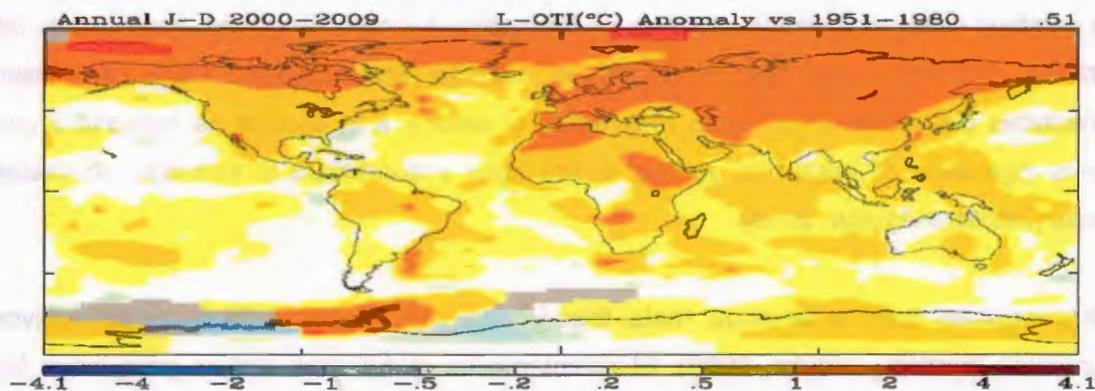


Figura I.1 Temperatura promedio de la década del 2000 al 2009. Este mapa fue generado por GISS/ NASA (2010) a partir de las temperaturas promedio de un período de 10 años (2000-2009) considerado la década más cálida desde que se empezó a registrar la temperatura mundial, a mediados del siglo XIX, respecto a la media (0.51 °C) del período de 1951-1980 un período con poco incremento (0.17 °C por cada década). Los mayores aumentos de temperatura se registraron en el Ártico y la Península Antártica.

Battisti y Naylor, (2009) presentaron el daño que el calentamiento causará a los sistemas alimentarios futuros: usando los modelos del IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) calcularon que al final del siglo XXI las temperaturas excederán a las mayores registradas entre 1900 y el 2006, tanto en el subtropical como en la mayor parte del trópico, áreas que se secarán, dificultando la agricultura. Tan solo en el verano del 2003 las cosechas mundiales de maíz y la de heno cayeron en un 30 %, la de fruta en 25 % y la de trigo en 21 %. En 1972 ocurrió algo equivalente en la Unión Soviética, haciendo subir el precio de la tonelada de trigo de 60 dólares a 208 dólares (Battisti y Naylor, 2009). Finalmente mencionan que en Ucrania, las temperaturas estivales superiores a 30 °C serán la norma a mediados del siglo XXI. También serán afectadas las zonas templadas y será muy difícil compensar la menor producción de alimentos en una región con excedentes de otra.

Se siguen modificando los regímenes climáticos que tradicionalmente han caracterizado a las bandas latitudinales, con una zona de convergencia intertropical modificada y con cambios en las zonas templadas y subtropicales; la expansión de la zona tropical conducirá al desplazamiento de las zonas subtropicales hacia los polos, es decir hacia latitudes más altas, donde se ubican la mayoría de los desiertos (McMullen y Hayden, 2009). Las presiones de la agricultura y la expansión urbana se verán exacerbadas por los cambios esperados en los patrones de temperatura y precipitaciones, producto de los cambios globales. Con todo el escenario descrito anteriormente habrá que crear variedades de plantas y animales resistentes al calor y a la sequía; se necesitará una nueva ingeniería de irrigación, ya que faltará agua y aumentará la salinidad en vastas zonas (Montoya-Aguilar, 2009).

Los principales cultivos de arroz, maíz, trigo y soya cubren casi el 75 % de los cultivos mundiales (Battisti y Naylor, 2009). El calentamiento global será dañino para todos los países y sólo una eficiente adaptación al clima cambiante podrá reducir los daños; por ejemplo, África es un continente con clima marginal, agua insuficiente y con temperaturas altas, un aumento de la temperatura provocaría que muchas zonas agrícolas sean menos productivas y otras incultivables por completo (Tan y Shibasaki, 2003).

I.2.2 Efecto del aumento de temperatura sobre las plantas

La temperatura alta, la luz intensa y la falta de agua se encuentran entre los principales tipos de estrés ambiental que afectan el crecimiento de las plantas y productividad de cultivos (Hewezi *et al.*, 2008); la tolerancia a temperaturas elevadas puede lograrse a través de varios mecanismos incluyendo cambios a nivel molecular, celular, bioquímico y fisiológico. A exposiciones prolongadas por encima de los 45 °C, la mayoría de los tejidos de plantas superiores (células vegetativas en crecimiento) son incapaces de sobrevivir, sin embargo las células que no están creciendo o los tejidos deshidratados pueden soportar temperaturas más altas, por ejemplo las semillas secas sobreviven a 120 °C y el polen hasta 70°C. Algunas plantas suculentas (CAM) como *Opuntia* y *Sempervivum* pueden tolerar temperaturas de 60 a 65 °C bajo intensa radiación solar de verano. En general los organismos unicelulares pueden completar su ciclo de vida por encima de los 50 °C y los procariotas sobreviven a temperaturas superiores a 60 °C (Taiz y Zeiger, 1998).

Los brotes de la mayoría de las plantas C3 y C4 con buen aporte de agua, se mantienen a temperaturas inferiores a 45 °C por el enfriamiento por evaporación; si el aporte de agua se limita, el enfriamiento por evaporación disminuye y la temperatura del tejido aumenta. Las plántulas que emergen en suelos húmedos constituyen una excepción a esta regla, ya que pueden ser expuestas a temperaturas superiores a las que generan el estrés por calor en comparación de las plántulas que se encuentran en suelos más secos, debido a que el suelo humedecido suele ser más oscuro y absorbe mayor radiación solar que un suelo más seco (Taiz y Zeiger, 1998).

Las altas temperaturas pueden afectar el intercambio de moléculas señal entre la raíz y el tallo, importantes en la coordinación espacial y temporal de la organización de la división, expansión y diferenciación celular (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). También pueden modular muchos procesos metabólicos y fisiológicos como el desarrollo y estructura del polen y las semillas, el crecimiento de hojas, la distribución de hidratos de carbono, el metabolismo del oxígeno reactivo, procesos mediados por auxinas, como elongación del hipocótilo y la fluidez de la membrana así como la actividad del fotosistema II (Hewezi *et al.*, 2008).

La estabilidad de las membranas celulares es afectada durante el estrés por altas temperaturas, ya que disminuye la fuerza de los puentes de hidrógeno y de las interacciones electrostáticas entre los grupos polares de las proteínas en fase acuosa de la membrana; las altas temperaturas modifican la estructura y composición de la membrana y provocan la pérdida de iones. La alteración de la membrana también provoca la inhibición de procesos como la fotosíntesis y la respiración, que dependen de la actividad de enzimas y proteínas transportadoras de electrones asociadas a la membrana, las cuales son menos estables o se desnaturalizan a elevadas temperaturas (Taiz y Zeiger, 1998); el daño a la membrana parece ser el principal causante de tal inhibición ya que las temperaturas para desnaturalizar las proteínas implicadas en fotosíntesis y respiración son mayores a las que producen el daño membranal (Hewezi *et al.*, 2008).

La fotosíntesis y la respiración constituyen los dos procesos fisiológicos más sensibles al estrés por altas temperaturas (Wahid *et al.*, 2007); su inhibición es común en las plantas expuestas periódicamente a estrés térmico, en especial cuando la temperatura es superior a 45 °C. Durante muchos años, el fotosistema II ha sido considerado el componente más sensible al calor de todo el aparato fotosintético, principalmente en el transporte fotosintético de electrones (Feng *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2000; Havaux y Tardy, 1996).

A altas temperaturas, enzimas como la ribulosa-1, 5 -bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPc) son menos estables (Feng *et al.*, 2007). Sin embargo estudios recientes parecen indicar que la fijación de CO₂ es más sensible al estrés térmico debido a la inhibición de la ribulosa-1, 5 -bisfosfato carboxilasa / oxigenasa. A medida que la temperatura aumenta, las tasas fotosintéticas disminuyen más rápidamente que las tasas respiratorias. La temperatura a la cual la cantidad de CO₂ fijada por la fotosíntesis iguala a la cantidad de CO₂ liberada por la respiración en un período de tiempo dado se denomina punto de compensación térmica o punto de compensación de la temperatura (Taiz y Zeiger, 1998).

A temperaturas superiores a la del punto de compensación de la temperatura, la fotosíntesis no puede reemplazar al carbono usado como sustrato de la respiración, como resultado las reservas de carbohidratos se reducen haciendo que frutas y verduras pierdan su sabor dulce; este desequilibrio entre fotosíntesis y respiración es una de las principales causas de los efectos perjudiciales de las altas temperaturas. En una misma planta, el punto de compensación térmico es normalmente más bajo en hojas de sombra que en las de sol, que están expuestas a la luz y al calor. A altas temperaturas, el incremento de la intensidad respiratoria con respecto a la fotosíntesis es más perjudicial en las plantas C_3 que en las plantas C_4 o las CAM, porque en las plantas C_3 , como lo es papaya, a altas temperaturas, aumenta tanto la intensidad de la respiración en oscuridad como la de la fotorrespiración (Taiz y Zeiger, 1998).

Aunque cada una de las diversas condiciones de estrés a la que una planta puede estar sometida tiene características distintivas según la especie y provoca sus respuestas específicas propias, ellas comparten características en común como el establecimiento de una situación oxidativa que representa una importante parte de los daños causados en el organismo estresado (Tognetti, 2006).

En plantas, las reacciones que consumen NADPH en la fotosíntesis son las más susceptibles a la inhibición debida al estrés ya que disminuyen los niveles de NADP y como consecuencia la cadena de transferencia de electrones como aceptor terminal no está disponible. Los intermediarios reducidos de la cadena pueden a continuación, participar en la transferencia de energía y de electrones hacia aceptores temporales, como el oxígeno, lo que resulta en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como los radicales superóxido, radicales H_2O_2 , radicales hidroxilo y radicales orgánicos basados en carbono (Yamane *et al.*, 2000).

También se ha notado que los niveles de Ferredoxina (proteína transportadora de electrones) disminuyen en las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), expuestas a los oxidantes o condiciones ambientales adversas, lo que implica también el compromiso potencial de varias vías de transporte de electrones dependientes de Fd (Tognetti, 2006).

I.2.3 Importancia económica y como modelo de estudio de *Carica papaya* L.

I.2.3.1 Características botánicas

La papaya es originaria del sur de México y Centroamérica, es una planta herbácea de crecimiento rápido con un gran número de hojas grandes y lobuladas, vive entre 15 y 30 años, aunque no resulta adecuado cultivarla por más de tres años ya que los frutos se vuelven más pequeños y la planta puede alcanzar varios metros dificultando su cosecha. Tiene un tallo hueco, segmentado y erecto puede medir de 2 m hasta 10 m. El peciolo también es hueco (Nakasone y Paull, 1998).

El sistema radicular está formado por una raíz principal (primaria) y varias secundarias. El estado sexual se determina en la floración (cuadro I.1), se pueden encontrar flores femeninas y flores masculinas en diferentes plantas, son frecuentes las plantas que presentan flores de ambos sexos o hermafroditas. El fruto generalmente es una baya, aunque tiene una gran diversidad de formas, el tamaño varía según la variedad y tipo de flor (Nakasone y Paull, 1998).

Cuadro I.1 Tipos de flor que existen en *Carica papaya* L.

Tipo de flor	Estado sexual
Pistilado	Femenina
Pentandria	Hermafrodita
Intermedio	Hermafrodita
Hermafrodita perfecta	Hermafrodita
Estigmada	Masculina

En el caso de *C. papaya* L. cv. Maradol es una variedad de origen cubano, se clasifica como semienana; desarrolla un tronco grueso, follaje exuberante, entrenudos cortos, presenta floración y fructificación tempranas. Se caracteriza por presentar descendencia de plantas femeninas que producen frutos redondos; los frutos alargados son producidos a partir de plantas hermafroditas y son los que México exporta principalmente a mercados de Estados Unidos, Canadá y Europa, dicha forma alargada la hace más fácil de empacar (más frutas por caja respecto a las redondas) además que su tamaño de 1.5 a 2.6 Kg y su

color interno son muy atractivos. Cada mercado de consumo tiene sus preferencias en cuanto a tamaño, forma, peso, color y sabor (SAGARPA, 2012). La clasificación científica de este importante frutal se presenta en el cuadro I.2.

Cuadro I.2 Clasificación taxonómica de *Carica papaya* L.

División	Spermatophyta
Subdivisión	Magnoliophytina
Clase	Magnoliatae
Orden	Brassicales
Familia	Caricaceae
Género	<i>Carica</i>
Especie	<i>papaya</i>
Cultivar/variedad	Maradol

I.2.3.2 Importancia económica

La papaya es considerada como uno de los frutales alternativos más importante del trópico por su uso en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. La fruta consumida fresca, contiene una concentración alta de vitaminas A, B1, B2 y C (Augstburger *et al.*, 2000). Puede encontrarse en varias presentaciones como en mermeladas, confituras, yogurt, néctares, pan, como saborizante, para dar consistencia o relleno en pasteles, fruta cristalizada, deshidratada, en rebanadas congeladas o pulpa. La papaína (una enzima proteolítica que se extrae del látex) se usa como ablandador de carne, remedio para problemas digestivos, clarificador de cerveza, champúes, lociones y cremas (Nakasone y Paull, 1998).

Las semillas sirven como harina, desparasitantes y antipirético; las flores sirven para combatir tos, bronquitis, úlceras estomacales y desinflamante de intestinos. Los tallos, peciolos y hojas tienen concentraciones pequeñas de carpaína, un alcaloide estimulante del ritmo cardíaco; las hojas pueden ser usadas como forraje, para curar heridas superficiales, combate de asma, sustituto de jabón y tabaco. La raíz se usa para aliviar dolor de cabeza y como enema para inducir el embarazo (FPC, 2003)

Los principales productores mundiales son India (3.9 millones de ton), Brasil (1.8 millones de ton), Indonesia (766 mil ton), Nigeria (764 mil ton) y México (616 mil ton) sin embargo en el año 2011, México ocupó el primer lugar de exportación, representando el 36.7 % del mercado mundial (90.3 mil ton) y Brasil ocupó el segundo lugar 12.2 % (30 mil ton); vale la pena recalcar que Estados Unidos fue el principal importador, con cerca de 100-150 mil ton y México abasteció el 74 % de ese total (115 mil ton). Una ventaja de esta fruta para nuestro país es que su producción y comercialización se da durante todo el año, en especial de marzo a junio; en los últimos diez años las exportaciones han crecido a una Tasa de Crecimiento Media Anual (TCMA) del 5.8 % (SAGARPA, 2012).

En México se siembran diferentes cultivares y tipos de papaya que se han nombrado en función del tamaño, forma, apariencia y procedencia de la fruta. Así tenemos que el cultivar hawaiano tiene frutos pequeños entre 400 y 600 g; la Maradol roja (de origen cubano) tiene frutos entre 1.5 y 2.5 Kg; y los tipos mexicanos Cera y Mamey, que pesan entre 2 y 6 kg (SAGARPA, 2012).

Conviene hacer la diferenciación entre tipos y cultivares (variedades), según Mandujano (1998) los primeros son aquellos materiales que no se manejan con polinización controlada, no tienen caracteres estables y tienen una gran heterogeneidad en la manifestación de ellos, lo que dificulta su descripción, como es el caso de los materiales criollos Cera, Coco y Mamey; mientras que los cultivares, han sido manejados mediante control de polinización y con base en la selección y mejoramiento genético. Los cultivares sembrados en México de forma experimental son: Maradol roja, Maradol amarilla, y algunos hawaianos como Red Lady y Cariflora entre otros. Sin embargo, sólo la Maradol roja se ha cultivado comercialmente en México desde 1988 y ha desplazado paulatinamente a los tipos criollos (SAGARPA, 2012).

Las entidades federativas con mayor crecimiento en el cultivo de papaya en los últimos años han sido Tabasco, Chiapas, Nayarit y Michoacán. En el 2011 el Estado de Chiapas fue el mayor productor (140,721.50 ton), le siguieron Veracruz (115,056.50 ton), Oaxaca (113,705.25 ton), Colima (59,134.31 ton), Guerrero (45,180.30 ton), Michoacán (45,147.26 ton), Yucatán (18,424.50 ton), Tabasco (16,257.00 ton), Quintana Roo (13,122.25 ton) y Campeche con 13,077.95 ton (SIAP, 2011).

Hasta 1993 el Estado de Yucatán no figuraba como una entidad federativa importante de producción de papaya, a partir del 2002 cuando ocupó el sexto lugar nacional, se ha mantenido entre los 10 primeros lugares de producción. El 75 % de la producción de papaya maradol en Yucatán, se comercializa en el mercado nacional, básicamente en las centrales de abasto de la Ciudad de México, Guadalajara y Monterrey; el 10 % se destina al mercado local y la zona sur de Quintana Roo, mientras que el 15 % restante se envía a Texas, Chicago, Atlanta y Florida. Durante el periodo de 1997 a 2007, en promedio se obtuvo 31,870 ton de este tipo de papaya (SAGARPA, 2012).

I.2.3.3 Modelo de estudio para frutos tropicales

Ming, *et al.*, (2008) secuenciaron el genoma de papaya transgénica *Carica papaya* cv SunUp mediante la técnica de secuenciación WGS (whole-genome shotgun), su genoma tiene 372 Mpb (número de accesión ABIM00000000, WGS scaffolds DS981520-DS984726). De acuerdo con estos autores la papaya es un sistema promisorio excepcional para la exploración de la genómica de árboles tropicales frutícolas; en comparación con *Arabidopsis thaliana*, *C. papaya* L. posee una reducción en promedio en el número de genes de aproximadamente 20 %, posee herencia diploide con nueve pares de cromosomas, corto período de generación (entre 9 a 15 meses), floración continua a lo largo del año y un sistema cromosomal sexual primitivo, finalmente mencionan que compartieron un ancestro común con *A. thaliana* alrededor de 72 millones de años.

La forma más práctica y eficiente de propagación es por semilla, siendo la temperatura de 30 °C y humedad relativa de 80-90 % (Gil y Miranda, 2008), aunque también se puede hacer de forma asexual o esquejes así como por propagación in vitro. De acuerdo con Nakasone y Paull (1998) el rango de temperatura para el crecimiento de papaya está entre 21 y 33 °C, siendo el óptimo entre 23 °C y 26 °C; a temperaturas menores de 17 °C las plantas hermafroditas pueden presentar carpeloidía en la totalidad de las flores y en general la planta inhibe su crecimiento. A temperaturas mayores de 35 °C las flores hermafroditas pueden deformarse en flores con partes femeninas no funcionales o pobremente desarrolladas, abscisión floral, menor producción de frutos y quemaduras en hojas (AGOGTR, 2008).

De forma interesante se ha visto que en *Carica papaya* L. cv. Pusa Nanha, a temperaturas elevadas (40 a 45 °C) y bajas (15 a 20°C) decrecieron los síntomas provocados por la infección del virus de la mancha anular en relación con las temperaturas ambientales de 26 °C a 31 °C (Mangrauthia *et al.*, 2009).

1.2.4 Regulación transcripcional

La expresión génica, es la responsable de la manifestación fenotípica debida a un genotipo determinado; hay genes que son expresados constitutivamente dentro de las células vegetales, mientras que otros responden a estímulos específicos (Liu *et al.*, 1999). La expresión aumenta o disminuye en respuesta a un programa inherente de desarrollo y a factores ambientales, entre éstos se encuentran factores bióticos como la interacción con patógenos y factores abióticos como la luz, temperatura, anoxia, sequía, exceso y deficiencia de nutrientes. Los factores de desarrollo pueden ser temporales y/o espaciales y coinciden con procesos tales como la germinación, el desarrollo de órganos (raíces, hojas, etc.), la transición hacia la morfología floral, la senescencia, embriogénesis, desarrollo de la semilla y la maduración de frutos (Yang *et al.*, 2004).

Tanto la expresión constitutiva como la inducible dependen de la interacción de factores de transcripción con elementos que actúan en *cis* y/o con otros factores de transcripción requeridos para la expresión génica, siendo importantes para las actividades celulares. A diferencia de los promotores procarióticos, las regiones promotoras de eucariontes no son reconocidas directamente por las ARN polimerasas sino que requieren de la participación de tales factores transcripcionales (Yang *et al.*, 2004).

Los factores de transcripción son proteínas de localización nuclear que se unen a secuencias específicas de ADN y que modulan la expresión de los genes al activar o reprimir la transcripción génica; su estudio en plantas superiores es aún limitado aunque en los últimos años se ha centrado en factores de transcripción tales como los b-Zip, factores relacionados con Myb y Myc, homeodominios, cajas-MADS y factores de unión a la Caja TATA (TBP) (Guo *et al.*, 2008).

El entendimiento de la regulación y la caracterización de los factores de transcripción es importante para comprender los procesos de transducción que conectan las señales externas con los procesos celulares que determinan los diferentes fenotipos que conocemos; menos estudiados son los factores de transcripción que intervienen en la respuesta de genes estimulados por el calor los cuales son llamados factores de transcripción de choque térmico, Hsfs (Heat shock factors o Heat stress transcription factors).

I.2.5 Factores de transcripción de choque térmico: Hsfs

I.2.5.1 Los factores de transcripción Hsfs en animales

En la literatura científica la respuesta al choque térmico (heat shock) básicamente se inicia con Rittosa en el año 1962, estudiando las glándulas salivares de la larva de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), él observó la presencia de un ensanchamiento en ciertas regiones de los cromosomas de la larva, que podían ser reproducidos mediante el aumento de temperatura. Unos años más tarde Tissières, *et al.*, (1974) relacionó la aparición de estos ovillos, entre el aumento de temperatura y el aumento en la síntesis de unas proteínas, que fueron llamadas "proteínas del choque térmico" (Heat shock proteins o Hsps).

Aunque la respuesta al choque térmico se descubrió por primera vez en animales (Ritossa, 1962) y en respuesta a aumento de temperatura, se ha documentado que es un mecanismo altamente conservado en todos los organismos desde levaduras hasta el ser humano y plantas. También es inducida por circunstancias proteotóxicas como: pH extremo, variación en la presión osmótica, hipoxia, estrés oxidativo, metales pesados, toxinas y las infecciones patogénicas. Bajo estas presiones ambientales la célula viva responde por inducción selectiva o sobreexpresión de genes protectores de choque térmico llamados genes hsp (heat shock proteins) que codifican para proteínas del mismo nombre (proteínas Hsps). La conservación entre diferentes eucariotas sugiere que la respuesta al choque térmico es esencial para la supervivencia en un ambiente estresante (Akerfelt *et al.*, 2007).

Por estudios en animales y algunas plantas como *Arabidopsis* y Tabaco, se sabe que la expresión de genes hsp, es modulada por los factores de transcripción de choque térmico (Hsfs) y que el principal papel de éstos en la célula es la transducción de la señal del medio ambiente con respecto al estrés térmico, transmitiendo esta información a la maquinaria transcripcional, para finalmente producir diversas chaperonas moleculares. Se sugiere que la activación de los factores de transcripción Hsfs se puede dar a partir del contacto con los dominios hidrofóbicos de proteínas desnaturalizadas (Akerfelt *et al.*, 2007; Jurivich *et al.*, 1992).

La transducción de la señal del estrés térmico hacia la maquinaria transcripcional se lleva a cabo a través de una cascada de eventos sobre los factores de transcripción Hsfs, que se regula en dos niveles: 1) trimerización inducida de choque térmico, localización nuclear y unión al ADN y 2) la adquisición de la competencia transcripcional (Cotto *et al.*, 1996; Jurivich *et al.*, 1992).

Antes de un evento estresante, los factores de transcripción Hsfs se encuentran en el citoplasma como monómeros y no pueden unirse al ADN (figura I.2 a). Los factores de transcripción Hsfs deben formar trímeros y ser activados (figura I.2 b); en animales se ha visto la formación tanto homotrímeros como heterotrímeros, mientras que en plantas es común la formación de homotrímeros. Una vez en el núcleo, se unen en las zonas promotoras HSE o elementos de choque térmico (heat shock element) de los genes hsp (figura I.2 c) y llevan a un incremento de su expresión corriente abajo (figura I.2 d), que confiere tolerancia al estrés (Pockley, 2001).

Las proteínas Hsps actúan como chaperonas moleculares en el plegamiento, localización intracelular y marcaje de proteínas celulares para su degradación; bajo condiciones de estrés, ellas se unen a las proteínas no plegadas, propensas a la agregación y las mantienen en un estado competente plegable. Las proteínas Hsps se clasifican en función de su masa molecular Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y sHsps (small Hsps < 40 kDa), mientras que sus masas moleculares monoméricas se encuentran generalmente en el rango de 12 a 43 kDa (Chowdary *et al.*, 2004).

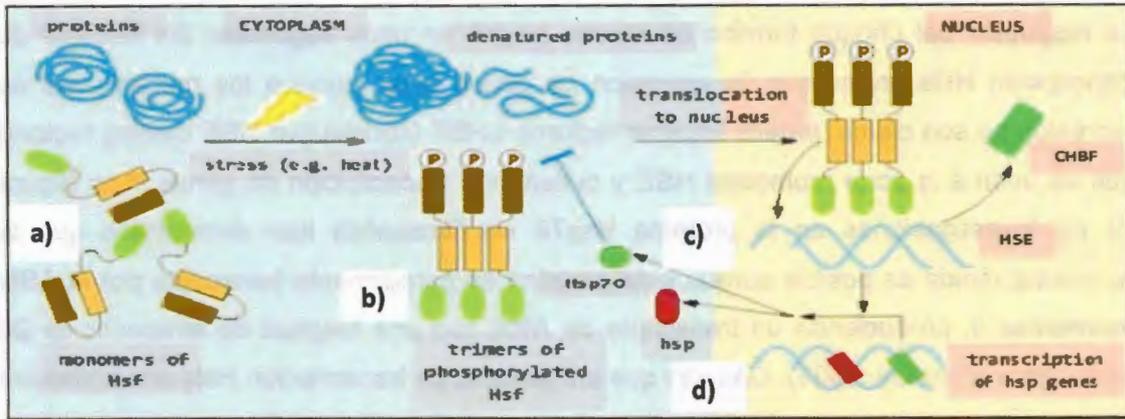


Figura I.2 Regulación de la transcripción de genes hsp por factores de transcripción Hsfs. **a)** en condiciones normales los factores de transcripción de choque térmico (Hsfs) se encuentran como monómeros en el citoplasma. **b)** bajo condiciones de estrés, los factores de transcripción Hsfs forman trímeros y se activan. **c)** el trímero es importado desde el citoplasma hacia el núcleo donde se unen a la zona promotora HSE de genes hsp y **d)** ocurre la transcripción de genes Hsps.

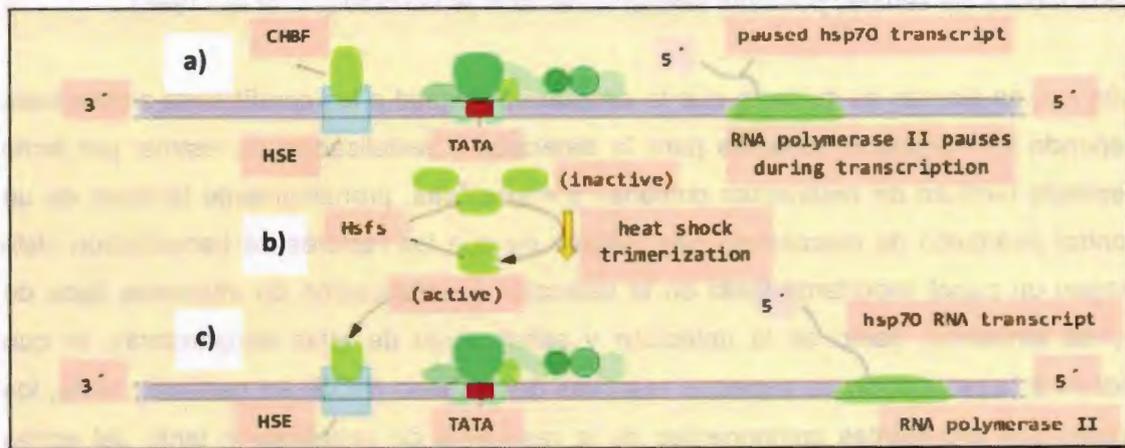


Figura I.3 Control de la síntesis de ARNm durante la transcripción de hsp70. **a)** la ARN polimerasa II se detiene después de sintetizar alrededor de 25 nucleótidos del transcrito a medida que CHBF (constitutive HSE binding factors) se une al HSE. **b)** después de un choque térmico, los factores de transcripción Hsfs son convertidos desde una forma inactiva hacia una forma activa que pueda unirse al ADN. **c)** unión de factores de transcripción de choque térmico Hsfs trimerizados (activados) hacia el elemento regulador de choque térmico (HSE) del promotor del gen hsp70, lo que libera a la ARN polimerasa II, conduciendo hacia una rápida transcripción del gen hsp70.

La respuesta del choque térmico es rápida, ocurre en unos segundos; los factores de transcripción Hsfs promueven la expresión de genes hsp, aunque los mecanismos de represión no son claros, parece implicar factores CHBF (constitutive HSE binding factors) que se unen a la zona promotora HSE y detienen la transcripción de genes hsp (figura I.3 a). Investigaciones en la proteína Hsp70 en *Drosophila* han demostrado que la respuesta rápida es posible porque esta proteína es parcialmente transcrita por la ARN polimerasa II, produciendo un transcripto de ARN con una longitud de alrededor de 25 nucleótidos (Pockley, 2001). Una vez que los factores de transcripción Hsfs son activados y forman trímeros, se unen al HSE reemplazando a CHBF (figuras I.3 b y c).

I.2.5.2 Los factores de transcripción Hsfs en plantas

En las plantas, los factores de transcripción Hsfs se han identificado como reguladores clave en la inducción de la respuesta de defensa en varios tipos de estrés ambiental, sin embargo el conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la transducción de señales por altas temperaturas aún es limitado (Liu *et al.*, 1998).

Aún así, en plantas es evidente que la adaptación vegetal a las condiciones ambientales depende de complejos sistemas para la detección y señalización de estrés; por tanto depende también de respuestas comunes y específicas, probablemente también de un control jerárquico de reacciones. Hay indicios de que los factores de transcripción Hsfs juegan un papel importante tanto en la detección y señalización de diferentes tipos de estrés ambiental, como en la detección y señalización de altas temperaturas, lo que induce a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en particular H_2O_2 , los cuales son importantes componentes de la respuesta de señalización tanto del estrés biótico como abiótico (Hewezi *et al.*, 2008).

En plantas, como en animales, los factores de transcripción Hsfs regulan la expresión de genes hsp que codifican para las proteínas Hsps y también pueden ser clasificadas en cinco familias de proteínas evolutivamente conservadas, cada una con un mecanismo de acción (Parsell y Lindquist, 1993). La prevención de desnaturalización o el repliegue de las proteínas desnaturalizadas resultantes del calor por el estrés térmico parece ser la función principal de las proteínas Hsps (Hewezi *et al.*, 2008).

En los animales se encuentran pocos genes hsf, como en los vertebrados, donde se han identificado cuatro (hsf1-hsf4) mientras que en plantas se encuentran varios, por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* se han identificado 21 genes hsf y sus respectivos factores de transcripción Hsf. Los factores de transcripción Hsf en plantas se clasifican basándose en las características estructurales y comparación filogenética en tres clases (A, B y C) y varios subgrupos (Xiao *et al.*, 1999).

I.3 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

I.3.1 Preguntas de investigación

- ¿Se encuentran presentes los genes hsf, homólogos a los reportados en *Arabidopsis thaliana*, dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp?
- ¿A qué temperatura y tiempo de exposición, las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol se encuentran en estrés (punto de estrés térmico)?
- ¿Qué efecto tiene el estrés térmico sobre la fisiología de plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol en condiciones de estrés moderado, en el punto de estrés térmico y qué tan capaz es esta especie de recuperarse de dicho estrés?
- De estar presentes los genes hsf en el genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp ¿Cuál es el efecto sobre la expresión de estos, en condiciones de estrés moderado, en el punto de estrés térmico y durante su recuperación (etapa post estrés) en plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol?

I.3.2 Hipótesis

En base a las preguntas anteriores y la información presentada en la parte introductoria y de antecedentes de esta tesis, se plantearon las siguientes hipótesis.

1. Existen secuencias homólogas de genes hsf de *Arabidopsis thaliana* dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp, por ser éstas altamente conservadas en las especies hasta ahora estudiadas.
2. El incremento de temperatura así como un mayor tiempo de exposición, resultan en una afectación negativa de varios parámetros fisiológicos para las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol, en particular en el punto de estrés térmico. Sin embargo la capacidad de esta especie para recuperarse de dicho estrés depende de la intensidad y duración del estrés térmico
3. Los genes hsf están presentes en *C. papaya* L. cv. Maradol y cuando ésta se expone a altas temperaturas, los perfiles de expresión de tales genes cambian, en respuesta al estrés térmico, de manera más contrastante en el punto de estrés térmico y tal vez durante la recuperación de dicho estrés.

I.4 OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

I.4 .1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de diferentes temperaturas y tiempos de exposición sobre la fisiología y expresión de genes hsf en plantas jóvenes (70 días de edad) de *C. papaya* L. cv. Maradol.

I.4.1.1 Objetivos particulares

- Aislar *in silico* las secuencias homólogas de genes hsf de *Arabidopsis thaliana* en *C. papaya* L. cv. SunUp.
- Caracterizar la estructura y filogenia de los factores de transcripción Hsf codificados por los genes hsf en *C. papaya* L. cv. Maradol.
- Caracterizar la expresión basal de los genes hsf en plantas adultas de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo condiciones comerciales.

- Determinar el punto de estrés térmico, mediante la evaluación fisiológica de diferentes temperaturas y tiempos de exposición, sobre plantas jóvenes (70 días de edad) de *C. papaya* L. cv. Maradol.
- Evaluar los efectos sobre la fisiología y expresión de genes hsf en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo condiciones de estrés moderado, en el punto de estrés térmico y en la etapa post estrés.

1.4.2 Estrategia experimental

Esta tesis incluyó cuatro etapas principales, las cuales se resumen en la figura 1.4:

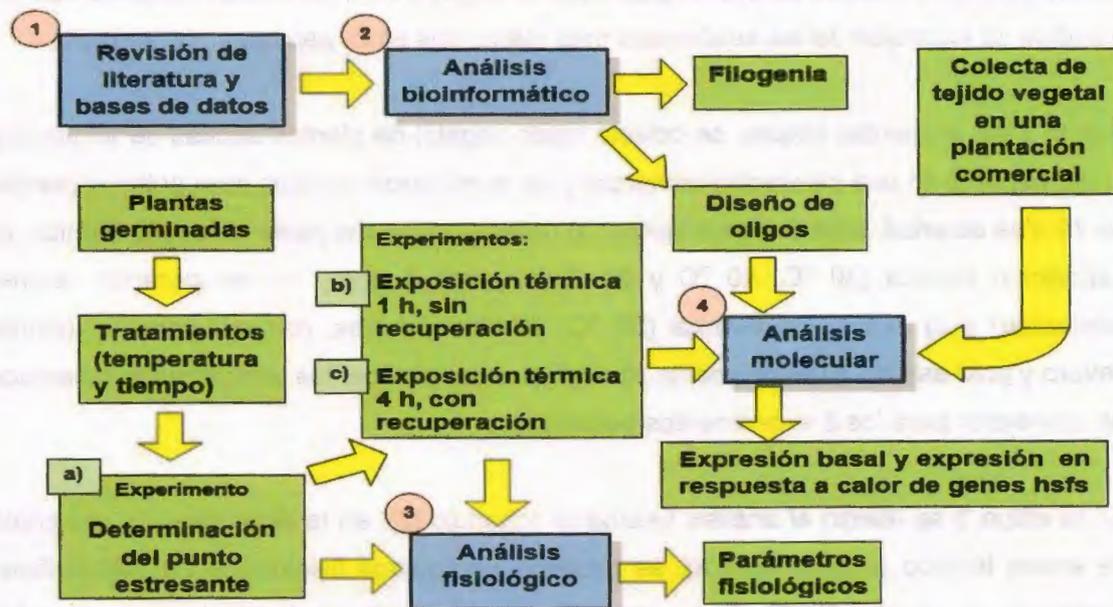


Figura 1.4. Diagrama metodológico. Este estudio, incluyó cuatro etapas principales (rectángulos azules) y varias actividades secundarias (rectángulos verdes). La etapa 1 consistió en la búsqueda de secuencias en diferentes bases de datos para el análisis bioinformático de la etapa 2. En la etapa 3 se realizó el análisis fisiológico a partir de plantas germinadas de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a tratamientos térmicos en tres experimentos (a, b y c). En la etapa 4 se realizó el análisis molecular, que consistió en el estudio de la expresión basal a partir de tejido vegetal de *C. papaya* L. cv. Maradol previamente colectado en una plantación comercial, así como también se incluyó el estudio de la expresión de genes hsf en respuesta a calor a partir de plantas jóvenes germinadas de *C. papaya* L. cv. Maradol y expuestas en los experimentos b y c.

En la etapa 1 se realizó una revisión de literatura científica y bases de datos, para obtener todas las secuencias, tanto nucleotídicas codificantes (genes hsf) como proteicas (factores de transcripción Hsfs) de *Arabidopsis thaliana*.

La etapa 2, que correspondió al análisis bioinformático (Capítulo II) se compararon las secuencias antes mencionadas con el genoma de *Carica papaya* L. cv. SunUp; las secuencias nucleotídicas codificantes se utilizaron para obtener secuencias de nucleótidos homólogas hsf en *C. papaya* L. cv. SunUp, mientras que las secuencias proteicas Hsfs se usaron para definir los dominios característicos de los factores de transcripción Hsfs mediante la caracterización *in silico* de la estructura y filogenia. Las secuencias nucleotídicas se usaron para diseñar oligos y continuar posteriormente con los estudios de expresión de las secuencias más relevantes en *C. papaya* L. cv. Maradol.

Previo a las siguientes etapas, se colectó tejido vegetal de plantas adultas de *C. papaya* L. cv. Maradol en una plantación comercial y se germinaron semillas para obtener plantas de 70 días de edad, para 3 experimentos: a) determinación del punto de estrés térmico, b) exposición térmica (30 °C, 40 °C y 50 °C) durante 1 hora, sin recuperación (estrés moderado) y c) exposición térmica (50 °C) durante 4 horas, con recuperación (estrés severo y post estrés). El experimento a) sirvió para establecer las temperaturas y tiempos de exposición para los 2 experimentos posteriores.

En la etapa 3 se realizó el análisis fisiológico (capítulo III), en la determinación del punto de estrés térmico (experimento a), se midieron parámetros fisiológicos no destructivos: fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s), mientras que para los experimentos b) y c), los análisis fisiológicos incluyeron parámetros no destructivos también destructivos: fuga de iones, contenido relativo de agua y contenido de pigmentos.

La etapa 4 correspondió al análisis molecular (capítulo IV), se partió de los oligos de los genes hsf seleccionados y diseñados en la etapa 2. La etapa 4 incluyó, tanto el estudio de expresión basal a partir de tejido vegetal de plantas adultas previamente colectado como el estudio de los patrones de expresión por efecto de altas temperaturas a partir de tejido vegetal de plantas jóvenes germinadas y expuestas a diferentes temperaturas y tiempos en los experimentos b y c.

I.5 REFERENCIAS

- Akerfelt, M., Trouillet, D., V. Mezger y L. Sistonen (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1113, 15–27.
- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., J. Miiz y C. Streit (2000). Papaya en: *Agricultura Orgánica en el trópico y subtrópico*, Asociación Naturland. Alemania. pp. 1-38.
- 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.
- Battisti, D. y R. Naylor (2009). Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science*, 323(5911), 240-244.
- Busch, W., M. Wunderlich y F. Schoffl (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thailiana*. Blackwell Publishing Ltd. *The Plant Journal*, 41,1–14.
- Chowdary, T.K., Raman, B., T. Ramakrishna y C.M. Rao (2004). Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity. *Biochem. J.* 381, 379–387.
- Cotto, J. J., M. Kline y R. I. Morimoto (1996). Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. *J Biol Chem*, 271, 3355-3358.
- Feng, L., Wang, K., Li, Y., Tan, Y., Kong, J., Li, H., Y. Li y Y. Zhu (2007). Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, 26,1635–1646.
- Fundación Produce Chiapas A.C (2003). *Cadena agroalimentaria de la papaya Maradol en: Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología del Estado de Chiapas*. En colaboración con el Instituto Tecnológico de Monterrey. pp 44-52. México.
- Gil, A. I y D. Miranda (2008). Efecto de la temperatura, inmersión en agua y concentración de fitorreguladores sobre la germinación de semillas de papaya (*Carica papaya L.*) *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2(1), 9-20.
- Goddard Institute for Space Studies, 2010. *Second Warmest Year on Record; End of Warmest Decade* [Online] (actualizado 21 febrero de 2010). Disponible en: <http://www.giss.nasa.gov/research/news/20100121/> [Acceso 10 octubre 2010].

- Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Y. Wang y J. Wang (2008). Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. *Pub Med*, 35(2), 105-18
- Havaux, M. y F. Tardy (1996). Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: Possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta*, 198, 324-333.
- Hewezi, T., M. Léger y L. Gentzbittel (2008). A Comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Gene Expression in Sunflower. *Annals of Botany*, 102, 127–140.
- Horowitz, J. K. (2009). The Income–Temperature Relationship in a Cross-Section of Countries and its Implications. Springer Science Business Media B.V. *Environ Resource Econ*, 44, 475–493.
- Jurivich, D. A., Sistonen, L., R. A. Kroes y R. I. Morimoto (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science*, 255, 1243–1245.
- Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., F. Bicker y P. von Koskull-Döring (2004). Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant Journal*, 39(1), 98-112.
- Liu, L., M. J. White y T. H. MacRae (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem*, 262, 247-257.
- Mandujano, R. A (1998). Papayo y su producción en México, en: *Fruticultura avanzada. Cultivo, manejo y exportación*. Fundación Salvador Sánchez Colín y CICTAMEX-CONACYT. México. pp. 86-106.
- Mangrauthia, S. K., Singh Shakya, V. P., R. K Jain y S. Praveen (2009). Ambient temperature perception in papaya for papaya ringspot virus interaction. Springer Science Business Media, LLC. *Virus Genes*, 38(3), 429-434.
- McMullen C. y T. Hayden (2009). Anuario: avances y progresos científicos en nuestro cambiante medio ambiente. División de Evaluación y Alerta Temprana del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Kenya. pp 21-30.
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J., Senin, P., Wang, W., Ly, B., Lewis, K., Salzberg, S., Feng, Lu., Jones, Meghan., Skelton, R., Murray, J., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R., Michael, T., Wall, K., Rice, D., Albert, H., Wang, M., Zhu, Y., Schatz, M., Nagarajan, N., Acob, R., Guan, P., Blas, A., Wai, C., Ackerman, C., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J., Shakirov, E., Haas, B., Thimmapuram, Jyothi., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J., Gschwend, A., Delcher, A., Singh, R., Suzuki, J., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, Ning., Zhang, W., L.

- Wang y M. Alam (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190), 991–996.
- Montoya-Aguilar, C. (2009). Salud, cambio climático y contaminación. Actualización acerca de las fuentes alternativas de energía en Chile. *Cuadernos Médicos Sociales (Chile)* 49(4), 280-307.
- Nakasone H. Y. y R. E. Paull (1998). Papaya, in: *Tropical fruits. Crop production science in horticulture N°7*. CAB International Publication (ed), Wallingford UK, pp. 239-269.
- National Climatic Data Center State, 2011. Global temperature highlights [Online] (actualizado 7 noviembre de 2011).
Disponible en: <http://www.ncdc.noaa.gov/sotc/>
[Acceso 27 diciembre 2011].
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H., L. Macías-Rodríguez y J. López-Bucio (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 701-712.
- Pockley A.G (2001) Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Cambridge University Press.
- Ritossa, F (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571–573.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2012. Boletín Frutas: México, gran comerciante y competidor exterior de frutas [Online] (actualizado 7 de julio de 2012).
Disponible: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Boletin1-Frutas.aspx>
[Acceso 8 agosto de 2012].
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2011. Sistema Producto Papaya: Anuario de Producción Agrícola [Online] (actualizado 20 febrero de 2012).
Disponible:
http://www.campomexicano.gob.mx/portal_sispro/index.php?portal=papaya
[Acceso 8 septiembre de 2012].
- Taiz, L. y E. Zeiger (1998). *Plant physiology*. Sinauer Associates, Massachussets, second edition, 740-745 p.
- Tan, G. y R. Shibasaki (2003). Global estimation of crop productivity and the impacts of global warming by GIS and EPIC integration. Elsevier Science B.V. *Ecological Modelling*, 168(3), 357-370.
- Tissiéres, A., H.K. Mitchell y U.M. Tracy, (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* relation to chromosome puffs. *J.Mol. Biol*, 84, 389-398.

- Tognetti, V., Palatnik, J., Fillat, M., Melzer, M., Hajirezaei, M., E. Valle y N. Carrillo (2006). Functional Replacement of Ferredoxin by a Cyanobacterial Flavodoxin in Tobacco Confers Broad-Range Stress Tolerance. *The Plant Cell*, 18, 2035–2050.
- Wahid, A., Gelani, S., M. Ashraf y M. R. Foolad (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and experimental botany*, 61, 199-223.
- Xiao, X; Zuo, X; Davis, A. A; McMillan, D. R; Curry B. B; J.A. Richardson y I. J. Benjamin (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*, 18, 5943–5952.
- Yamane, Y., Shikanai, T., Kashino, Y., H. Koike y K. Satoh (2000). Reduction of QA in the dark: Another cause of fluorescence for increases by high temperature in higher plants. *Photosynthesis Research*, 63, 23-34.
- Yang, Z. R., Wang, X.C., X. M. Li y C. D. Yang (2004). Transcription factors in higher plant. *Pub Med*, 26(3),403-438.

CAPITULO II

ANALISIS *in silico* DE LA FAMILIA HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTORS EN EL GENOMA DE *Carica papaya* L. cv. SunUp A PARTIR DE *Arabidopsis thaliana*.

II.1 INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha en varias plantas han sido estudiados los efectos por altas temperaturas por su importancia alimenticia y económica, como es el caso del tomate, arroz o del maíz. Sin embargo en *Carica papaya* L. cv. Maradol son escasos los estudios acerca del efecto por altas temperaturas que incluyan aspectos bioinformáticos, fisiológicos y moleculares; estos estudios han sido realizados típicamente en *Arabidopsis thaliana* por ser una planta que ofrece diversas ventajas.

A. thaliana constituye el ejemplo más representativo de una planta sin utilidad alimenticia, medicinal o industrial que ha sido ampliamente utilizada para diversos estudios. Es una mala hierba, de tamaño reducido, perteneciente a la familia Brassicaceae que se ha empleado como principal modelo en el estudio científico debido a sus características únicas que ofrecen una serie de ventajas a la hora de considerarla como modelo de investigación. Entre estas características se encuentran que es un verdadero diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógama y produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años (EcuRed, 2010).

Su crecimiento rápido permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo de tiempo y por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios; facilidad de transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens* y mediante el plásmido Ti es posible introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable (Zhang *et al.*, 2006). Su genoma es pequeño (157 Mpb), posee 5 cromosomas con relativamente escasas secuencias repetidas y un bajo contenido en ADN (aproximadamente 70 Mpb por núcleo haploide), la hacen con diferencia, la planta superior de genoma más pequeño conocido y por lo tanto, un sistema ideal para estudios

genéticos y moleculares. Asimismo, por sus características, fue el objeto de un proyecto de secuenciación a gran escala y en el año 2000 fue la primera planta en ser completamente secuenciada (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Actualmente, se tiene acceso en todo el mundo al genoma completo, que contiene cerca de 30,000 genes codificantes, un número comparable al de los humanos (TAIR, 2010).

En esta tesis se hace uso de la bioinformática, utilizando parte del amplio conocimiento en *A. thaliana* como una herramienta computacional para el estudio de los genes del choque térmico (heat shock transcription factors) o también referidos como genes heat shock factors (genes hsfs) en *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a temperaturas altas. Ante eventos estresantes, como temperaturas elevadas, los genes hsfs codifican para unas proteínas del mismo nombre llamadas proteínas Hsfs, las cuales actúan como factores de transcripción siendo así el componente terminal de una cascada de señales de transducción en Eucariotes al regular la expresión de genes involucrados en el choque térmico (Hewezi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 1999).

El conocimiento sobre la familia heat shock factors se debe tanto al estudio de los factores de transcripción Hsfs como al estudio de los genes hsfs que los codifican. Los factores de transcripción Hsfs reconocen motivos palindrómicos de unión, llamados elementos de choque térmico HSE (5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3' o 5'-nTTCnnGAAnnTTCn-3') conservados en los promotores de genes inducibles al calor de todos los eucariotas. Los genes diana clásicos son los genes hsps que codifican para proteínas del choque térmico (heat shock proteins), una vez unidos los factores de transcripción Hsfs en la región promotora HSE de los genes que poseen este motivo, llevan a un incremento de su expresión corriente abajo, que confiere tolerancia al estrés; los genes hsps codifican para proteínas Hsps las cuales actúan como chaperonas moleculares en el plegamiento, localización, distribución intracelular y marcaje de proteínas celulares dañadas para su degradación. Bajo estrés, las chaperonas moleculares se unen a las proteínas no plegadas o aquellas propensas a la agregación, manteniéndolas en un estado plegable competente, como parte de la homeostasis proteica (Akerfelt *et al.*, 2007; Chowdary *et al.*, 2004; Agashe y Hartl, 2000).

Antes de unirse al motivo HSE, es necesaria la trimerización de los factores de transcripción Hsfs a través de la formación de un triple trenzado en espiral de hélice alfa como requisito previo para la alta afinidad de unión al ADN y posteriormente, para la activación transcripcional de los genes hsp, gracias a unos dominios característicos existentes en los factores de transcripción Hsfs (Liu *et al.*, 1998; Nover *et al.*, 1997).

Los factores transcripcionales Hsfs muestran una estructura modular básica con un dominio de unión al ADN (DBD, Dna-Binding Domain), un dominio de oligomerización (OD, Oligomerization Domain), una señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal), una señal de exportación (NES, Nuclear Export Signal) y un dominio de activación C-terminal (CTAD, C-Terminal Activation Domain); estos dominios se pueden apreciar en la figura II.1. La parte más conservada en todos los factores de transcripción Hsfs y cercana al extremo N-terminal es el dominio DBD, el cual consiste de 4 láminas β antiparalelas rodeadas de 3 hélices α (Nover y Scharf, 1997; Schultheiss *et al.*, 1996; Wu, 1995; Damberger *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1994; Vuister *et al.*, 1994). En el dominio DBD el motivo central hélice-giro-hélice (H2-T-H3, helix-turn-helix) es requerido para el reconocimiento específico del ADN (Cicero *et al.*, 2001; Littlefield y Nelson, 1999); el motivo HTH es común en proteínas involucradas en regulación de expresión génica. Otro dominio muy conservado, es el dominio de oligomerización (OD) el cual es bipartito y contiene 2 regiones hepta-hidrofóbicas (HR, Hydrophobic Region) denominadas HR-A y HR-B, las cuales son esenciales para la oligomerización (Kotak *et al.*, 2004; Nover *et al.*, 2001).

En relación a los otros dominios funcionales, se sabe que 2 grupos de aminoácidos básicos funcionan como señal de localización nuclear (NLS), el dominio bipartito NLS representa un racimo de residuos básicos (K, R) reconocidos por el receptor NLS esenciales para la importación nuclear. Las secuencias de exportación NES son ricas en leucina en la región hidrofóbica HR-C (Heerklottz *et al.*, 2001; Mattaj y Englmeier, 1998; Lyck *et al.* 1997).

El dominio menos conservado en tamaño y secuencia es el CTAD, el cual está presente sólo en algunos factores de transcripción Hsfs. La función de activación como factores de transcripción de las proteínas Hsfs está relacionado con el pequeño motivo peptídico llamado AHA en el centro del dominio CTADs. AHA está caracterizado por residuos de aminoácidos aromáticos (W, F, Y), hidrofóbicos (L, I, V) y ácidos (E, D) (Kotak *et al.*, 2004; Döring *et al.*, 2000; Nover *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis thaliana* existen 21 miembros de la familia hsf pertenecientes a las tres clases A (15), B (5) y C (1) (Nover *et al.*, 2001). Los factores de transcripción de la Clase A, poseen el motivo AHA que promueve la activación transcripcional, las comparaciones de secuencias indican que un motivo activador AHA con secuencia consenso FWxx (F/L) (F// L) combinado a una secuencia adyacente de exportación nuclear (NES) representa una firma característica de muchos factores de transcripción Hsfs de la clase A (Koskull-Döring *et al.*, 2007). Los de clase B y C no poseen dicho motivo (Kotak *et al.*, 2004), suponiendo así que los de la clase B y C no tienen actividad regulatoria de sí mismos y su función está relacionada a la represión y co-activación (Bharti *et al.*, 2004; Kotak *et al.*, 2004). En la figura II.1 se presentan 3 factores de transcripción del choque térmico Hsfs de cada una de las clases en *A. thaliana*. A diferencia de los vertebrados donde se usan sólo números, en plantas para referirnos a los genes hsf s o a los factores de transcripción Hsfs, se anteponen las iniciales del nombre científico, que consiste en la especie y género, y al final también se indica la clase a la que pertenecen.

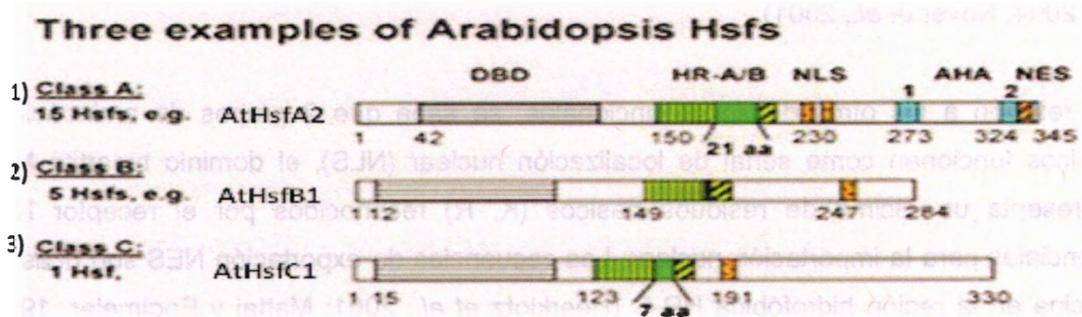


Figura II. 1 Factores de transcripción del choque térmico Hsfs en *A. thaliana*. Se ejemplifica cada una de las tres clases existentes en *A. thaliana*: A, B y C, así como los dominios característicos de cada clase. **1)** Se hace referencia a un miembro de la clase A. **2)** Corresponde a una miembro de la clase B y **3)** es el único miembro reportado de la clase C en *A. thaliana* (Baniwal, *et al.*, 2004).

En relación a *C. papaya* L. Ming *et al.* (2008) proponen esta planta como un buen modelo de estudio para frutos tropicales. Ellos secuenciaron el genoma de papaya transgénica *C. papaya* L. cv. SunUp mediante la técnica de secuenciación WGS (Whole-Genome Shotgun); de acuerdo con estos autores la papaya es un sistema promisorio excepcional para la exploración de la genómica de árboles tropicales frutícolas. Su genoma tiene 372 Mpb (número de accesión ABIM000000000, WGS scaffolds DS981520-DS984726).

Carica papaya L. es una de las frutas tropicales más importantes con carácter comercial, es la primera fruta modificada genéticamente (resistencia al virus de la mancha anular) y su genoma ha sido secuenciado en su totalidad (*Carica papaya* L. cv. SunUp) y debido a que es un cultivo relativamente rápido con un tamaño de genoma pequeño, la papaya potencialmente puede ser un modelo de estudios moleculares para frutos tropicales (Ming *et al.*, 2008).

En comparación con *A. thaliana*, *C. papaya* L. posee una reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20%, herencia diploide con nueve pares de cromosomas, corto período de generación (entre 9 a 15 meses), floración continua a lo largo del año, un sistema cromosomal sexual primitivo y compartieron un ancestro común hace de 72 millones de años (Ming *et al.*, 2008).

En este capítulo se planteó como objetivo la caracterización *in silico* de la estructura y filogenia de los factores de transcripción Hsfs codificados en el genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 Búsqueda de secuencias hsfs en *Arabidopsis thaliana*

Se realizó una revisión de las secuencias nucleotídicas (genes hsfs) y de aminoácidos (secuencias proteicas Hsfs) reportados para *Arabidopsis thaliana* en 3 bases de datos. Las bases de datos fueron The Arabidopsis Information Resource (Swarbreck *et al.*, 2008), Plant Transcription Factor Database, versión 2.0 (Zhang *et al.*, 2011) y Plant Transcription Factor Database, versión 3.0 (Perez-Rodríguez *et al.*, 2009).

II.2.2 Aislamiento *in silico* de genes tipo hsf en *Carica papaya* L. cv. SunUp

Las secuencias nucleotídicas de *A. thaliana*, previamente descargadas de las 3 bases de datos, fueron utilizadas como sonda (query) para encontrar los genes homólogos tipo hsf en *C. papaya* L. cv. SunUp. Se realizó un Blast Local mediante la herramienta TBLASTX (Zhang, et al., 2000) con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit versión 7.0.9.0, Hall, 1999) para aislar *in silico* las secuencias homólogas a *A. thaliana* dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp (Taxid: 3349) registrado en Phytozome (<http://www.phytozome.net>). Los parámetros generales del alineamiento fueron los siguientes: 500 secuencias con hits significativos para mostrar, 250 secuencias máximas de alineamientos para mostrar, un valor esperado de $E \leq 10$ y se establecieron parámetros de puntuación donde se utilizó la matriz BLOSUM62.

II.2.3 Selección de secuencias homólogas tipo hsf en *Carica papaya* L. cv. SunUp

A partir de los resultados obtenidos con el programa BioEdit (Hall, 1999) se seleccionaron las secuencias nucleotídicas con mayor similitud mediante el programa Blast Parser versión 1.2 (<http://geneproject.altervista.org/>). La elección de las secuencias dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp se realizó a partir de secuencias codificantes con valores de $E \leq 10^{-14}$, con valores de porcentaje de identidad y similitud $> 60\%$. Estas secuencias fueron posteriormente traducidas en sus seis marcos de lectura posibles (FGENESH).

II.2.4 Predicción del marco de lectura abierto (ORF)

La predicción de los marcos de lectura abiertos (ORF, Open Reading Frame) de las secuencias nucleotídicas seleccionadas de *C. papaya* L. cv. SunUp se realizó mediante el programa bioestadístico de algoritmos de predicción de genes FGENESH (Softberry, Inc.) utilizando el código genético de plantas dicotiledóneas (*Arabidopsis*) y edición con la herramienta TRANSLATE (Swiss Institute of Bioinformatics) con el formato de salida que incluyó las secuencia proteica. Cada secuencia proteica predicha se corroboró al ser buscada dentro de la base de datos de NCBI en el apartado de dominios conservados, para comprobar que se trataba de una proteína Hsf.

II.2.5 Alineamiento de secuencias proteicas e identificación de dominios conservados en *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. SunUp

Se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias proteicas Hsfs de *A. thaliana* y las secuencias proteicas predichas en *C. papaya* L. cv. SunUp, utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999) mediante la herramienta ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). El formato de salida fue .doc.

II.2.6 Análisis filogenético entre *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. SunUp

Se realizó un primer alineamiento múltiple a partir de las secuencias proteicas Hsfs de *A. thaliana* encontradas en las 3 bases de datos. También se realizó un segundo alineamiento entre éstas y las secuencias proteicas predichas en *C. papaya* L. cv. SunUp. En ambos casos se utilizó el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). A partir del segundo alineamiento se generó una matriz de distancia (porcentaje de identidad) con la finalidad de asignar el posible nombre a cada secuencia predicha. La matriz se realizó utilizando 39 secuencias de aminoácidos; ésta se basó en el modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) y muestra el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La tasa de variación entre sitios fue modelado con una distribución gamma de 5 categorías. Un total de 68 posiciones que contenían datos faltantes fueron eliminadas.

A partir de los dos alineamientos se obtuvieron los 2 mejores modelos evolutivos. Después se construyeron dos árboles con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando el método de caracteres mediante la prueba de filogenia evolutiva Maximum likelihood, el modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT), con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, supresión completa de Gaps, datos perdidos y una contribución uniforme de los sitios. El primer árbol se realizó mediante la agrupación por clados a partir de las 21 secuencias de aminoácidos Hsfs de *A. thaliana* alineadas previamente; un total de 70 posiciones que contenían datos faltantes fueron eliminadas. Para el segundo árbol se utilizaron las 21 secuencias de aminoácidos Hsfs de *A. thaliana* y las 18 secuencias proteicas predichas de *C. papaya* L. cv. SunUp, es decir un total de 39 secuencias; un total de 68 posiciones que contenían datos faltantes fueron eliminadas.

II.2.7 Diseño de oligonucleótidos de genes hsf s en *Carica papaya* L. cv. SunUp

El diseño de oligonucleótidos de los genes hsf s para el análisis de expresión por RT-PCR semi cuantitativo (Capítulo IV) en plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol se realizó mediante la asistencia de los programas FastPCR (Kalendar *et al.*, 2009) y PrimerSelect Lasergene versión 7.2.1. (Burland, 2000). Los oligonucleótidos fueron diseñados con las siguientes características: Tm mayor a 50 °C, una proporción de GC del 50 % y preferentemente que el amplicón se encontrara en el área central de la secuencia predicha y que incluyera por lo menos un intrón. Los oligonucleótidos finalmente fueron enviados a sintetizar a una casa comercial.

En base a la literatura reportada, las secuencias homólogas obtenidas, la matriz de distancia y árbol filogenético se eligieron 6 genes hsf para estudiar en esta tesis en plantas de *Carica papaya* L. cv. Maradol expuestas a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Obtención de secuencias hsf s en *Arabidopsis thaliana*

De la revisión, en las 3 bases de datos, se encontraron 21 secuencias nucleotídicas hsf s y sus correspondientes 21 secuencias de aminoácidos Hsf s en *Arabidopsis thaliana*, pertenecientes a la familia heat shock transcription factors. Las 21 secuencias nucleotídicas se presentan en el cuadro II.1; están clasificadas en 3 clases y el nombre de cada hsf inicia con las 2 letras iniciales del nombre de la especie a la que pertenecen (At, *A. thaliana*). Las secuencias hacen referencia a los siguientes genes hsf s: AthsfA1a, AthsfA1b, AthsfA1d, AthsfA1e, AthsfA2, AthsfA3, AthsfA4a, AthsfA4c, AthsfA5, AthsfA6a, AthsfA6b, AthsfA7a, AthsfA7b, AthsfA8, AthsfA9, AthsfB1, AthsfB2a, AthsfB2b, AthsfB3, AthsfB4 y AthsfC1.

Cuadro II.1 Secuencias nucleotídicas hsf's en *Arabidopsis thaliana* revisadas en 3 bases de datos.

Clase	Grupo	Número	Nombre	Locus	Bases de datos *		
					1	2	3
A	A1	1	AthsfA1a	AT4G17750	X	X	X
		2	AthsfA1b	AT5G16820	X	X	X
		3	AthsfA1d	AT1G32330	X	X	X
		4	AthsfA1e	AT3G02990	X	X	
	A2	5	AthsfA2	AT2G26150	X		X
	A3	6	AthsfA3	AT5G03720	X	X	X
	A4	7	AthsfA4a	AT4G18880	X	X	X
		8	AthsfA4c	AT5G45710	X	X	X
	A5	9	AthsfA5	AT4G13980	X	X	X
	A6	10	AthsfA6a	AT5G43840	X	X	X
		11	AthsfA6b	AT3G22830	X	X	X
	A7	12	AthsfA7a	AT3G51910	X	X	X
		13	AthsfA7b	AT3G63350	X	X	X
	A8	14	AthsfA8	AT1G67970	X	X	X
	A9	15	AthsfA9	AT5G54070	X	X	X
B	B1	16	AthsfB1	AT4G36990	X	X	X
	B2	17	AthsfB2a	AT5G62020	X	X	X
		18	AthsfB2b	AT4G11660	X	X	X
	B3	19	AthsfB3	AT2G41690	X	X	X
	B4	20	AthsfB4	AT1G46264	X	X	X
c	c	21	AthsfC1	AT3G24520	X	X	X

* Cada una de las 3 bases de datos se muestran a continuación: 1) The Arabidopsis Information Resource, 2) Plant Transcription Factor Database, versión 2.0, y 3) Plant Transcription Factor Database, versión 3.0.

II.3.2 Aislamiento *in silico* de genes tipo hsf's en *Carica papaya* L. cv. SunUp

A partir del Blast Local utilizando la herramienta TBLASTX se seleccionaron dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp, 18 secuencias hsf's homólogas a las secuencias nucleotídicas hsf's reportadas en *A. thaliana*, como se puede ver en el cuadro II.2. Las secuencias nucleotídicas hsf's en *C. papaya* L. cv. SunUp presentaron porcentajes de identidad entre 62 % y 93 % y de similitud entre el 75 % y 100 %. El valor esperado se encontró entre $E= 10^{-26}$ y $E= 10^{-155}$.

Cuadro II.2 Secuencias de nucleótidos hsf con la mayor homología encontradas en el genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp.

N°	Locus	Longitud del segmento (pb)	Longitud del alineación (pb)	% de Identidad	% de Similitud	Valor E	Score
1	supercontig_43.94	1509	1206	81	89	3E-88	285
2	supercontig_50.58	1131	1003	70	82	4E-67	437
3	supercontig_90.16	1572	1512	86	92	1E-128	488
4	supercontig_7.163	1074	867	82	97	3E-97	458
5	supercontig_5.77	612	576	70	81	6E-28	263
6	supercontig_124.4	1251	1206	87	93	1E-124	542
7	supercontig_157.44	1464	1422	72	86	1E-155	453
8	supercontig_27.46	708	699	62	75	3E-35	281
9	supercontig_44.122	1071	1012	72	82	1E-81	441
10	supercontig_52.116	1110	819	72	90	1E-103	354
11	supercontig_2.169	1185	849	79	90	7E-99	269
12	supercontig_28.162	1440	1419	80	90	1E-77	436
13	supercontig_55.150	837	812	79	92	6E-88	448
14	supercontig_107.31	948	872	70	84	1E-86	456
15	supercontig_74.64	933	735	81	88	1E-107	559
16	supercontig_224.10	834	824	82	89	1E-66	427
17	supercontig_49.32	471	458	93	100	1E-60	349
18	supercontig_1780.1	975	899	75	86	8E-89	452

A partir de las 18 secuencias nucleotídicas hsf seleccionadas en *C. papaya* L. cv. SunUp Cphsfs (Cp, *C. papaya* L.) con la mayor similitud se predijeron 18 secuencias de aminoácidos CpHsfs, las cuales se corroboraron dentro de la base de datos de NCBI para comprobar que se trataba de una proteína Hsf o con características de las mismas.

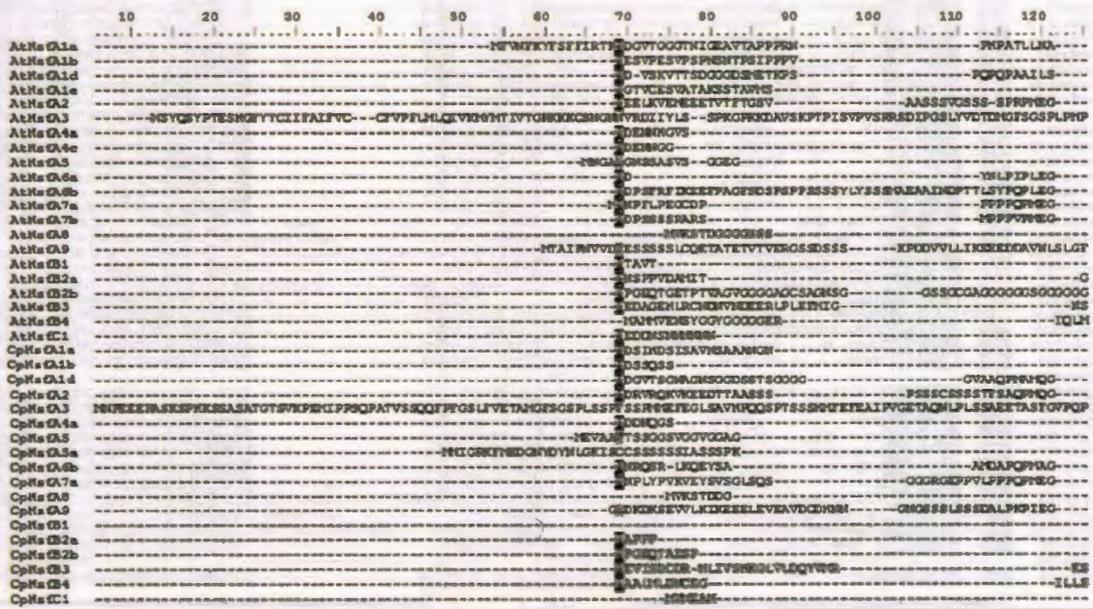
II.3.3 Selección de secuencias homólogas tipo hsf en *Carica papaya* L. cv. SunUp

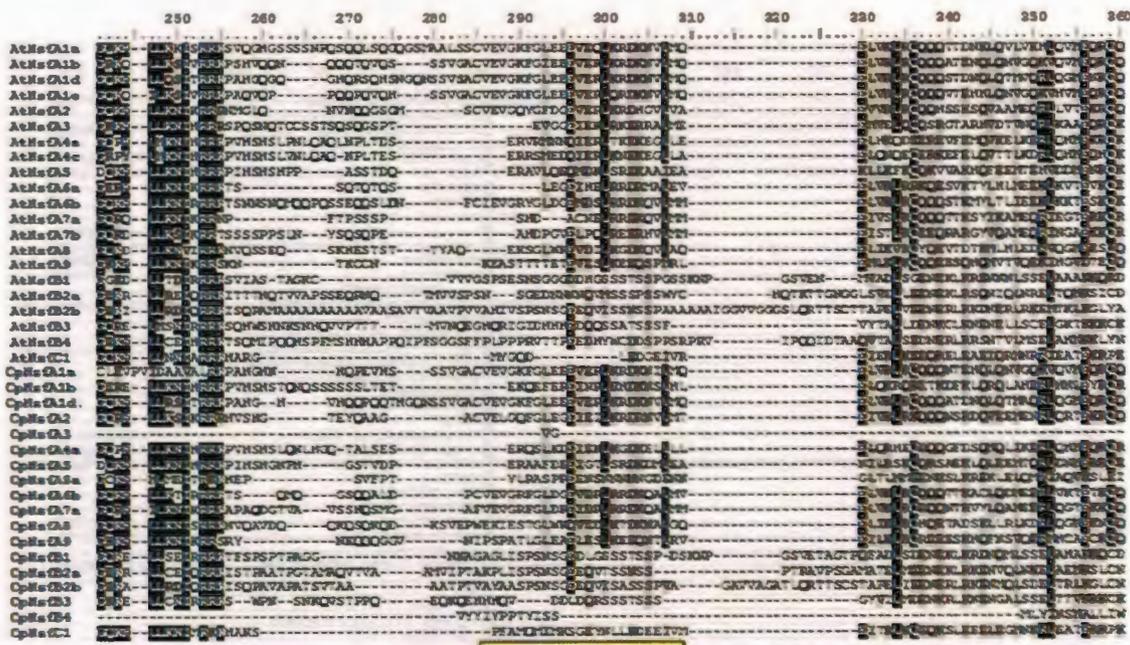
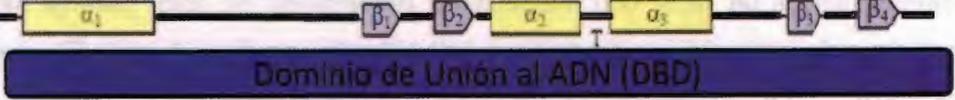
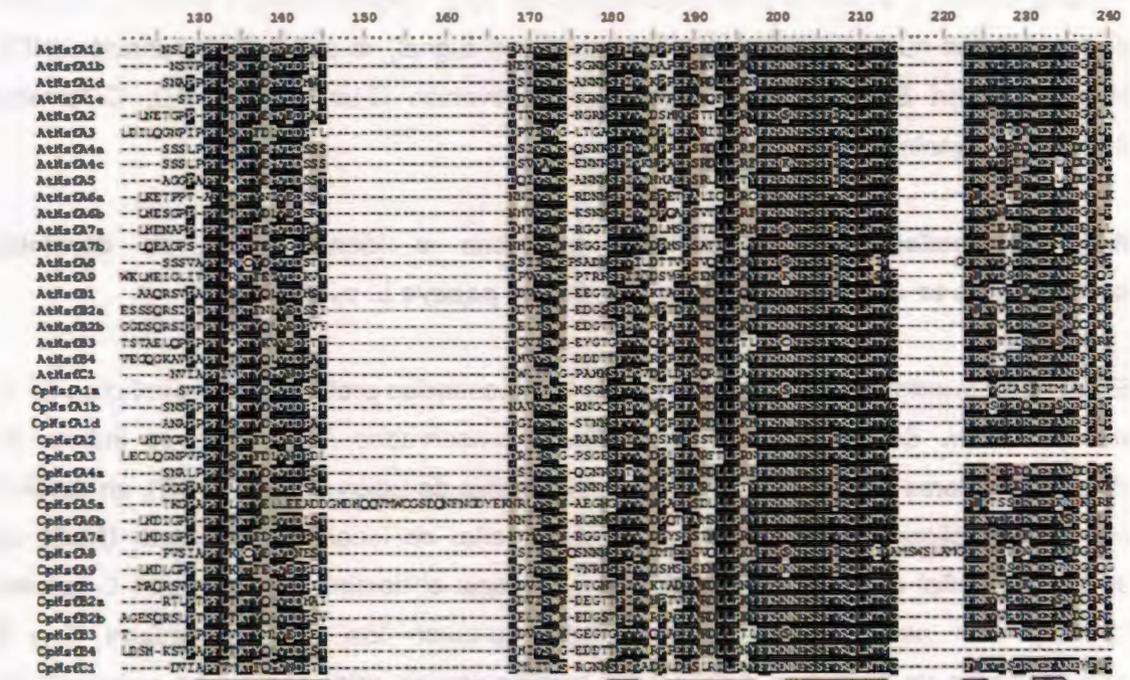
Una vez corroborado que se trataba de secuencias proteicas con características de Hsfs se obtuvo un alineamiento múltiple entre las secuencias proteicas Hsfs predichas en *C. papaya* L. cv. SunUp y las secuencias proteicas de *A. thaliana* previamente obtenidas de las bases de datos y así verificar la existencia de dominios característicos de los factores de transcripción Hsfs (figura II.2), tales como el dominio de unión al ADN (DBD, Dna-

Binding Domain), el dominio de oligomerización (OD, Oligomerization Domain), la señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal), la señal de exportación (NES, Nuclear Export Signal) y un dominio de activación C-terminal (CTAD, C-Terminal Activation Domain).

II.3.4 Alineamiento de secuencias proteicas e identificación de dominios conservados en *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. SunUp

En el alineamiento múltiple se observó que las secuencias proteicas Hsfs predichas en *C. papaya* L. cv. SunUp presentaron dominios conservados, los cuales se indican en diferentes colores (figura II.2): en morado el dominio de unión al ADN (DBD), en verde el dominio de oligomerización (OD), en rojo la señal de localización nuclear (NLS), en amarillo la señal de exportación (NES) y en naranja el dominio de activación C-terminal (CTAD). Con asteriscos de color rojo se marcaron los residuos básicos K y R característicos de NLS, con asteriscos y rectángulos de color naranja se señalaron los residuos de aminoácidos aromáticos (W) hidrofóbicos (L) y ácidos (E) característicos del dominio CTAD. Con asterisco amarillo se indicó L en NES.





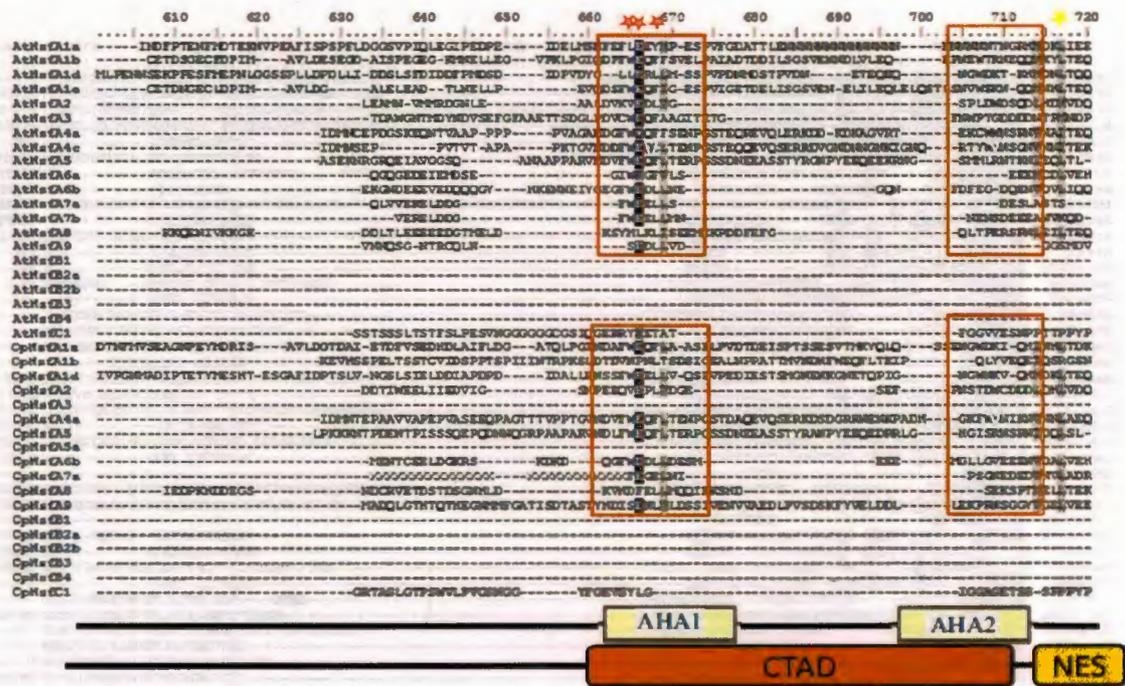


Figura II.2 Alineamiento de secuencias proteicas Hsfs de *A. thaliana* y secuencias proteicas Hsfs predichas en *C. papaya* L. cv. SunUp. En color negro se muestra el alineamiento de aminoácidos idénticos, en gris similares y blanco divergentes. Los dominios se señalan en morado (DBD), en verde (OD), rojo (NLS), naranja (CTAD) y amarillo (NES).

II.3.5 Análisis filogenético entre *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. SunUp

Una vez que se comprobó que las secuencias proteicas Hsfs predichas en *C. papaya* L. cv. SunUp presentaron dominios conservados característicos de proteínas Hsfs y con la finalidad de asignarles un nombre a cada secuencia CpHsf se calculó una matriz de distancia (a veces también referido como porcentaje de identidad) entre las secuencias proteicas Hsfs de *A. thaliana* y las secuencias Hsfs predichas de *C. papaya* L. cv. SunUp (cuadro II.3). Vale la pena recalcar que la asignación del nombre también fue verificado con la agrupación de las secuencias en el árbol filogenético (figura II.4). En el cuadro II.3 a la izquierda, se hace énfasis en el código (superconting) de la secuencia proteica Hsf predicha en el genoma *C. papaya* L. cv. SunUp, se refiere a la secuencia de nucleótidos que contiene a la región homóloga hsf dentro de *C. papaya* L. cv. SunUp a partir de la cual se predijo la proteína Hsf y se mantuvo el mismo nombre por razones de practicidad.

Para asignar el nombre a cada secuencia proteica predicha se le antepuso las iniciales Cp, se le añadió la letra de la clase y se realizó su posible clasificación en base al porcentaje de identidad con las secuencias de *A. thaliana* (cuadro II.3). A la primera secuencia proteica del cuadro, predicha a partir del supercontig_107_31, se le asignó el nombre de CpHsfB2a puesto que su mayor porcentaje de identidad fue 65.56 % en relación a AtHsfsB2a; a la segunda secuencia proteica, identificada con el código supercontig_124_4, se le asignó CpHsfA4a, ya que presentó un 84.79 % en relación a AtHsfA4a y así sucesivamente se realizó la asignación de los nombres a las secuencias restantes.

Un caso particular fue la última secuencia de la tabla. En este caso fue la secuencia con el código supercontig_90_16, la cual presentó dos porcentajes de identidad muy similares 87.46 % (en relación a AtHsfA1a) y 87.40 % (en relación a AtHsfA1d); en esta tesis se eligió el mayor valor numérico obtenido a partir de la matriz de distancia y se nombró CpHsfA1a, aunque el nombre debe tomarse con cierta reserva.

En relación a la asignación de los nombres de las secuencias restantes, están pueden verse en el cuadro II.3 mientras que las secuencias de manera ordenada por clases A (12), B (5) y C (1) se presentan en el cuadro II.4.

Cuadro II.3 Matriz de distancia entre las secuencias proteicas Hsf de *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. SunUp

Código identificación*	<i>C. papaya</i> **	<i>Arabidopsis thaliana</i> ***																				
		A1a	A1b	A1d	A1e	A2	A3	A4a	A4c	A5	A6a	A6b	A7a	A7b	A8	A9	B1	B2a	B2b	B3	B4	C1
supercontig_107_31	CpHsfB2a	46.82	34.21	45.89	39.80	30.50	37.51	45.46	40.26	33.94	22.98	32.80	28.75	26.32	19.94	21.98	58.60	65.56	59.44	38.75	61.36	13.17
supercontig_124_4	CpHsfA4a	69.53	64.05	72.36	67.02	53.04	48.22	84.79	67.59	59.58	45.67	55.99	55.06	43.63	41.58	40.58	49.32	33.97	35.11	35.59	42.51	29.91
supercontig_157_44	CpHsfA5	60.94	56.59	63.77	59.78	50.50	38.14	58.62	47.28	73.28	43.15	38.58	35.72	28.28	36.64	30.74	44.18	30.04	30.32	37.88	47.24	33.00
supercontig_1780_1	CpHsfC1	50.37	45.78	39.52	46.19	45.46	39.02	37.32	29.15	40.14	39.04	46.93	42.80	48.66	28.65	21.37	9.51	14.48	17.84	15.61	21.42	78.66
supercontig_2_169	CpHsfA8	51.26	45.03	54.35	48.40	47.81	28.19	46.40	31.49	55.09	24.17	39.30	46.33	23.32	76.91	43.29	25.71	16.18	85.67	12.53	8.34	20.91
supercontig_224_10	CpHsfB3	35.11	27.83	36.60	31.27	26.99	30.73	33.18	29.85	39.99	18.76	27.45	29.33	18.88	3.70	1.29	55.06	42.22	46.40	75.99	48.98	3.91
supercontig_27_46	CpHsfA5a	34.29	36.04	33.33	27.93	30.60	20.24	27.13	20.22	51.08	13.93	32.55	26.39	21.35	15.11	18.92	37.69	21.07	28.90	20.63	19.24	4.78
supercontig_28_162	CpHsfA9	56.93	44.81	47.22	42.27	64.02	30.22	41.87	30.84	47.62	33.87	43.73	54.12	50.75	38.87	70.90	17.06	19.23	9.48	6.47	16.18	24.56
supercontig_43_94	CpHsfA1b	72.11	80.38	76.03	78.47	64.98	51.45	59.90	46.32	51.38	47.45	61.28	52.45	43.40	50.87	44.06	48.41	35.00	31.39	38.82	45.05	37.62
supercontig_44_122	CpHsfA6b	67.57	71.30	67.52	70.40	62.18	46.53	52.46	31.99	48.49	69.19	72.70	62.68	62.38	52.40	41.28	37.68	35.54	29.77	29.58	34.08	42.88
supercontig_49_32	CpHsfB4	46.48	38.97	51.37	39.99	26.53	33.06	49.98	40.25	42.18	32.66	32.35	32.55	35.29	7.93	9.05	55.15	47.30	57.61	42.56	78.73	24.57
supercontig_5_77	CpHsfA3	45.24	28.84	41.81	31.51	20.41	71.01	28.85	13.01	21.40	14.07	28.37	35.36	30.50	11.17	15.36	20.57	26.30	21.32	8.79	25.61	24.38
supercontig_50_58	CpHsfA1d	67.52	67.24	69.79	65.89	43.85	49.67	54.54	43.38	50.25	36.12	52.08	45.48	46.29	28.89	38.15	47.95	43.35	44.52	42.16	41.70	25.30
supercontig_52_116	CpHsfA7a	61.50	66.13	57.43	61.05	66.16	51.45	48.30	29.55	37.64	48.63	66.44	82.92	78.75	40.53	46.29	40.00	33.96	31.17	30.52	31.54	38.92
supercontig_55_150	CpHsfB1	49.58	48.51	53.59	52.63	39.92	38.47	39.23	35.99	43.45	30.52	38.74	27.11	21.54	28.54	28.99	72.37	48.47	55.13	39.99	57.46	34.05
supercontig_7_163	CpHsfA2	70.91	57.02	61.15	54.55	79.52	43.14	56.10	42.64	50.36	54.05	62.88	64.16	56.55	46.23	58.85	34.43	31.67	20.28	16.33	19.55	42.56
supercontig_74_64	CpHsfB2b	39.50	32.63	42.83	30.09	22.38	32.86	35.75	33.41	39.26	22.60	22.55	21.62	22.31	5.86	6.53	60.13	68.24	85.95	42.55	65.26	18.10
supercontig_90_16	CpHsfA1a	87.46	81.45	87.40	82.85	62.93	60.66	63.49	44.32	57.01	53.78	60.04	55.82	45.87	49.54	48.51	49.74	37.64	42.88	46.51	55.22	44.45

* El código se refiere a la secuencia de nucleótidos que contiene a la región homóloga hsf dentro de *C. papaya* L. cv. SunUp con la cual se predijo la proteína Hsf y se mantuvo el mismo nombre por practicidad. ** Hsf en *C. papaya* L. cv. SunUp. *** Todos los nombres de las secuencias Hsf en *A. thaliana* presentados en la parte superior se abreviaron omitiendo la palabra "AtHsf" y sólo se indica la letra de la clase y el grupo. Dentro la matriz se señaló en negro los mayores porcentajes para cada secuencia CpHsf.

Cuadro II.4 Asignación del nombre de las 18 secuencias proteicas en *Carica papaya* L. cv. SunUp, ordenadas por clase.

Clase	Código identificación*	<i>C. papaya</i> **	% Identidad
A	supercontig_90_16	CpHsfA1a	87.46
	supercontig_43_94	CpHsfA1b	80.38
	supercontig_50_58	CpHsfA1d	69.79
	supercontig_7_163	CpHsfA2	79.52
	supercontig_5_77	CpHsfA3	71.01
	supercontig_124_4	CpHsfA4a	84.79
	supercontig_157_44	CpHsfA5	73.28
	supercontig_27_46	CpHsfA5a	51.08
	supercontig_44_122	CpHsfA6b	72.70
	supercontig_52_116	CpHsfA7a	82.92
	supercontig_2_169	CpHsfA8	76.91
B	supercontig_28_162	CpHsfA9	70.90
	supercontig_55_150	CpHsfB1	72.37
	supercontig_107_31	CpHsfB2a	65.56
	supercontig_74_64	CpHsfB2b	85.95
	supercontig_224_10	CpHsfB3	75.99
C	supercontig_49_32	CpHsfB4	78.73
	supercontig_1780_1	CpHsfC1	78.66

* El código hace referencia a la secuencia de nucleótidos homóloga hsf dentro de *C. papaya* L. cv. SunUp (superconting) a partir de la cual se predijo la proteína Hsf. ** Hsf en *C. papaya* L. cv. SunUp.

En relación a los 2 árboles filogenéticos obtenidos, cuando se realizó el primer árbol para las secuencias proteicas de *A. thaliana* (figura II.3) se formaron dos clados principales. En el primer clado se encontraron secuencias de la clase A y C mientras que en el segundo todas fueron de la clase C. Cuando se obtuvo el segundo árbol entre *A. thaliana* y *C. papaya* L. cv. SunUp (figura II.4) se encontraron dos clados principales y 4 subclados. En el primer clado se agruparon secuencias de la clase A y C mientras que en el segundo secuencias tanto de la clase B y A.

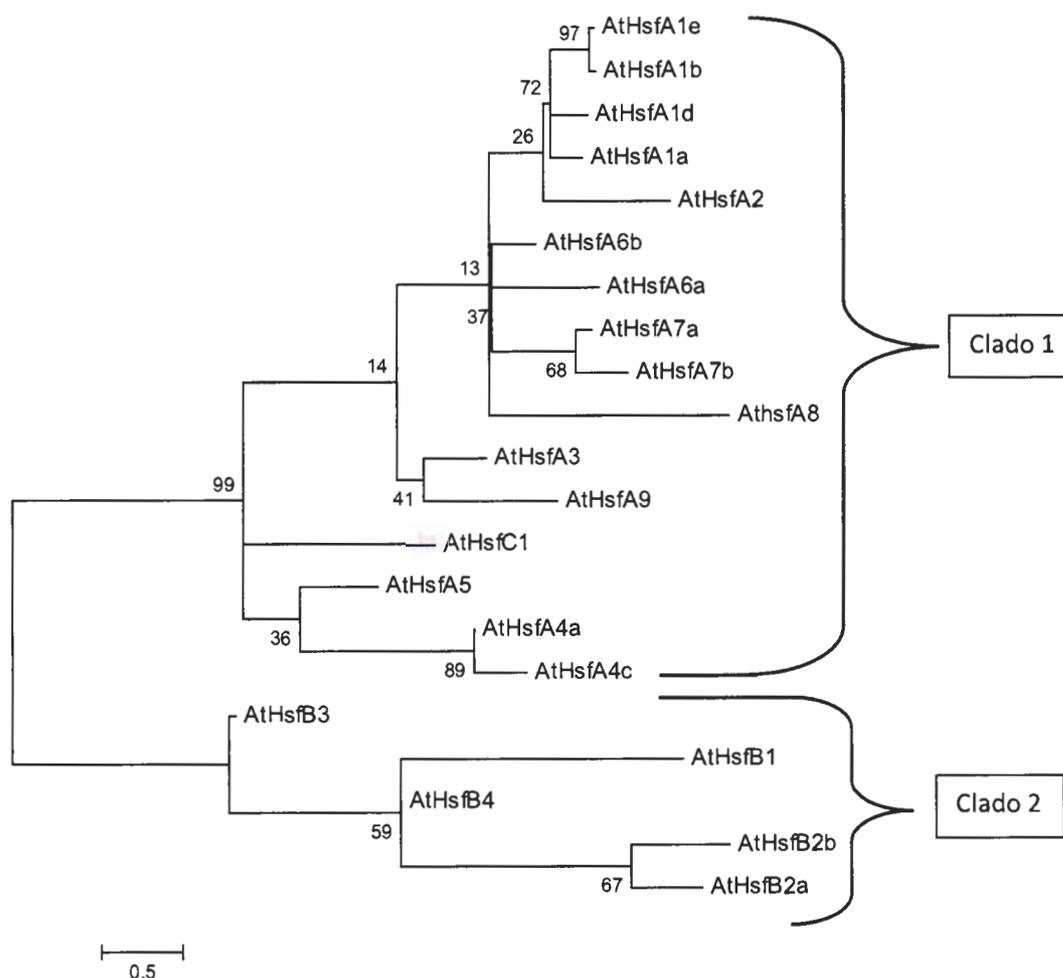


Figura II.3. Árbol filogenético de secuencias proteicas Hsfs en *Arabidopsis thaliana* (AtHsf). Se obtuvo a partir del método (algoritmo) de Maximum Likelihood y el mejor modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT). La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva. Se utilizó una distribución gamma discreta con categoría =5 para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios.

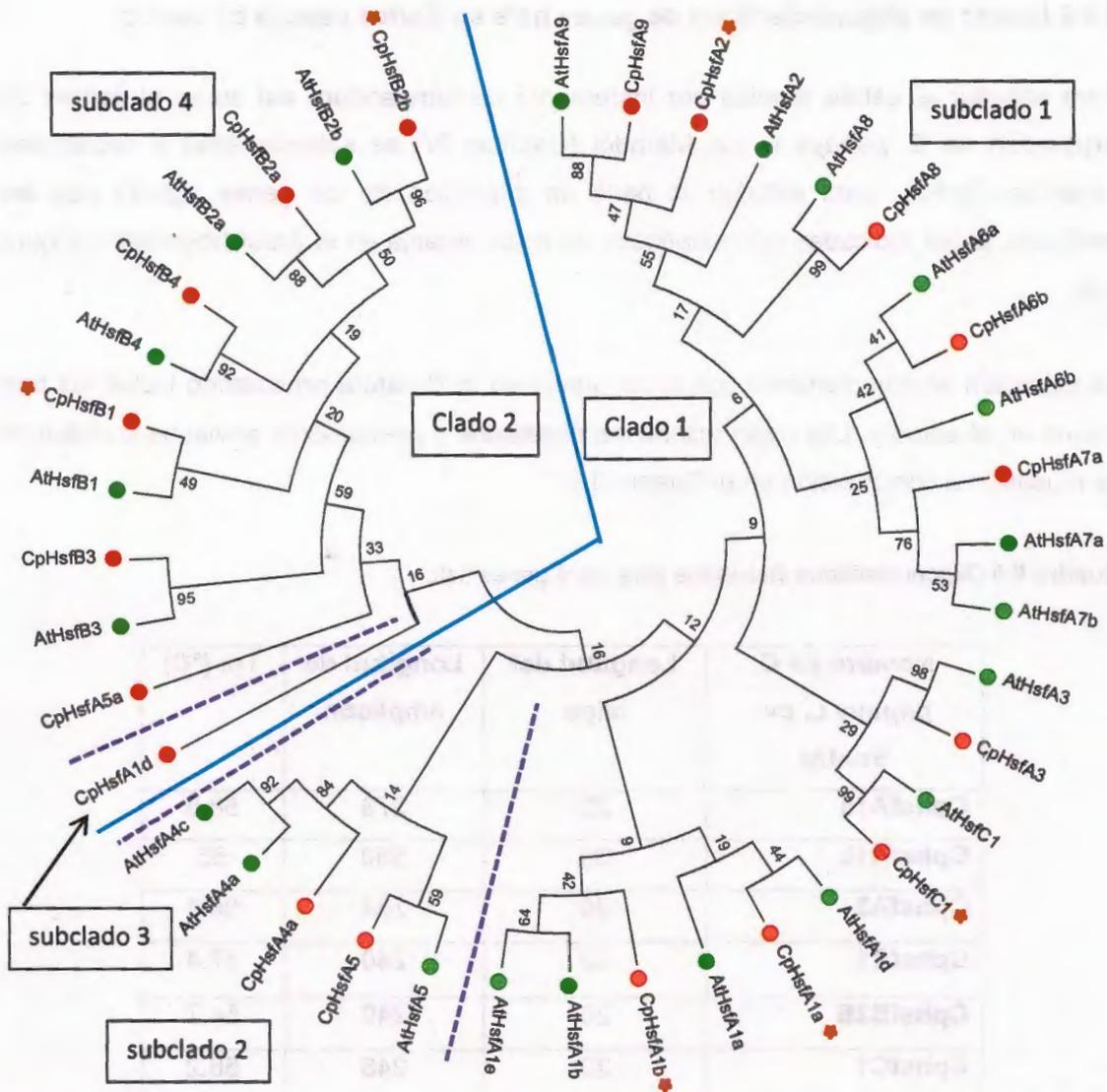


Figura II.4. Árbol filogenético entre *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. *SunUp*. Se muestra la relación existente entre las 21 secuencias proteicas AtHsfs (círculos verdes) y las 18 secuencias proteicas predichas CpHsfs (círculos rojos). El árbol se obtuvo a partir del método (algoritmo) de Maximum Likelihood y el mejor modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT). La construcción del árbol consenso bootstrap se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva. Se utilizó una distribución gamma discreta con categoría =5 para modelar las diferencias evolutivas entre los distintos sitios. La línea continua de color azul indica dos clados principales mientras que la línea discontinua en color morado indica subclados. Los asteriscos en color naranja indican las secuencias proteicas Hsfs, de las cuales se evaluó la expresión de sus genes hsf s en esta tesis, en el capítulo IV.

II.3.6 Diseño de oligonucleótidos de genes hsfs en *Carica papaya* cv SunUp

Para estudiar el estrés térmico por incremento de temperatura así como el tiempo de exposición en *C. papaya* L. cv. Maradol (Capítulo IV) se seleccionaron 6 secuencias proteicas Cphsfs, para estudiar el perfil de expresión de los genes Cphsfs que las codifican. Están indicadas con asteriscos de color naranja en el árbol filogenético (figura II.4).

La selección se complementó con lo reportado en la literatura procurando incluir las tres clases en el estudio. Los oligonucleótidos diseñados y previamente enviados a sintetizar se muestran a continuación en el Cuadro II.5.

Cuadro II.5 Oligonucleótidos diseñados para los 6 genes hsfs

Nombre en <i>C. papaya</i> L. cv. SunUp	Longitud del oligo	Longitud de amplicón	Tm (°C)
CphsfA1a	22	276	58.5
CphsfA1b	20	550	55
CphsfA2	20	254	56.1
CphsfB1	20	240	57.4
CphsfB2B	20	249	54.7
CphsfC1	20	248	56.2

II.4 DISCUSIÓN

Cuando se revisaron las 3 bases de datos, se encontraron 21 secuencias nucleotídicas hsf en *Arabidopsis thaliana* (Athsf) pertenecientes a la familia heat shock transcription factors también referidos como heat transcription factors (hsf) agrupados en 3 clases A, B y C. En la clase A se encontraron un total de 15 genes Athsf divididos en 9 grupos: AthsfA1a, AthsfA1b, AthsfA1d, AthsfA1e, AthsfA2, AthsfA3, AthsfA4a, AthsfA4c, AthsfA5, AthsfA6a, AthsfA6b, AthsfA7a, AthsfA7b, AthsfA8 y AthsfA9; en la clase B se encontraron 5 Athsf en 4 grupos: AthsfB1, AthsfB2a, AthsfB2b, AthsfB3 y AthsfB4 mientras que en la clase C sólo se encontró un Athsf perteneciente al único grupo en esta clase, este fue AthsfC1. Estas observaciones coinciden con lo reportado en los trabajos pioneros en el estudio de la respuesta del choque térmico en *Arabidopsis thaliana* por Nover (*et al.*, 2001), Nover y Scharf (1997), Nover (*et al.*, 1996).

En esta tesis se reporta por primera vez de manera integrada la caracterización *in silico*, identificación y relación filogenética de todos los posibles miembros de la familia heat shock factors involucrados en la respuesta del choque térmico dentro del genoma secuenciado en *C. papaya* L. cv. SunUp.

Se encontraron 18 secuencias nucleotídicas homólogas hsf dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp, respaldadas por porcentajes de identidad entre 62 % y 93 % y de similitud entre el 75 % y 100 % así como valores esperados entre $E = 10^{-28}$ y $E = 10^{-155}$. La presencia de secuencias hsf en *C. papaya* L. cv. SunUp es una evidencia más de su existencia conservada entre diversas especies estudiadas (Akerfelt *et al.*, 2007), como en tomate *Solanum peruvianum* (Chan-Schamnet *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2002), en soya *Glycine max* (Zhu *et al.*, 2006), arroz *Oryza japonica* (Wang *et al.*, 2009), maíz *Zea mays* (Lin *et al.*, 2011) y, aunque en estos casos corresponden a plantas con uso alimenticio, interesantemente también se ha realizado en Lily, *Lilium longiflorum* (Xin *et al.*, 2010) una planta con importancia en el mercado de flores.

El menor número de secuencias nucleotídicas hsf homólogas dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp (18) en relación a *A. thaliana* (21) es consistente con la reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20% que presenta *C. papaya* L. en

comparación con *A. thaliana* según lo reportado por Ming *et al.*, 2008. De hecho estos autores reportaron que *C. papaya* L. posee 19 homólogos hsf's en su genoma, un número que difiere a lo encontrado en esta tesis. Esta pequeña diferencia, podría deberse a que los resultados de Ming *et al.* 2008 fueron obtenidos a partir de un primer borrador (Draft) mientras que en esta tesis el genoma se obtuvo desde la base de datos de Phytozome, con última actualización del 2012 y sus parámetros de homologación pudieron ser diferentes a los utilizados en esta tesis. En la base de datos PInTFDB V 3.0 (2010) se encuentran registrados 18 superconting que contienen las regiones que codifican para factores de transcripción Hsf's a partir del genoma de *C. papaya* L. registrado en NCBI y se corroboró que son los mismos 18 encontrados en esta tesis.

Cuando se realizó el alineamiento múltiple entre las secuencias proteicas predichas de *C. papaya* L. cv. SunUp (CpHsf's) y las secuencias proteicas descargadas de bases de datos para *A. thaliana* (AtHsf's), se observó que las secuencias proteicas CpHsf's presentaron dominios conservados en relación a *A. thaliana* (figura II.2), sin embargo a pesar de que se encontraron dominios muy conservados (indicados en color negro para los aminoácidos idénticos) también se encontró divergencia entre las secuencias, evidenciada por aminoácidos indicados en color blanco. Los dominios mejor conservados fueron el dominio de unión al ADN (DBD, Dna-Binding Domain) y el dominio de oligomerización (OD, Oligomerization Domain) y es consistente con lo reportado en la literatura. En el caso del dominio DBD, también se señalaron las regiones correspondientes a las 4 láminas β antiparalelas y las 3 hélices α pertenecientes al motivo central hélice-giro-hélice (H2-T-H3, helix–turn–helix). Estas características corresponden con lo descrito por Nover y Scharf (1997), Schultheiss (*et al.*, 1996), Wu (1995), Damberger (*et al.*, 1994) Harrison (*et al.*, 1994) y Vuister (*et al.*, 1994).

Se encontraron 2 láminas β antiparalelas y 2 hélices α características en H2 mientras que en H3 se encontraron 2 láminas β antiparalelas y 1 hélice α . Según la literatura el motivo H2-T-H3 dentro del dominio DBD es requerido para el reconocimiento específico del ADN y es común en proteínas involucradas en regulación de expresión génica (Cicero *et al.*, 2001; Littlefield y Nelson, 1999). Con esta evidencia bioinformática, se fundamenta que las secuencias presentadas en esta tesis corresponden a factores de transcripción.

El segundo dominio mejor conservado encontrado a partir del alineamiento fue el dominio OD, el cual fue bipartito y con 2 regiones hepta-hidrofóbicas (HR, Hydrophobic Region) denominadas HR-A y HR-B, esenciales para la oligomerización y la formación de trímeros (Kotak *et al.*, 2004; Nover *et al.*, 2001).

También se identificó en las secuencias CpHsfs de la figura II.2, con asteriscos de color rojo, los residuos básicos K y R característicos de la señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal). Se sabe que el dominio bipartito NLS representa un racimo de residuos básicos (K, R) reconocidos por el receptor NLS esenciales para la importación nuclear. De igual forma se identificó la señal de exportación nuclear (NES, Nuclear Export Signal). Esta se caracteriza por el aminoácido Leucina (L) en la región hidrofóbica HR-C (figura II.2 indicado con un asterisco de color amarillo) (Heerklotz *et al.*, 2001; Mattaj y Englmeier, 1998; Lyck *et al.* 1997).

En la literatura es sabido que el dominio menos conservado en tamaño y secuencia es el dominio de activación CTAD (CTAD, C-Terminal Activation Domain) el cual está presente sólo en algunos factores de transcripción Hsfs de la clase A. La función de activación como factores de transcripción de las proteínas Hsfs está relacionado con el pequeño motivo peptídico llamado AHA el cual está caracterizado por residuos de aminoácidos aromáticos (W, F, Y), hidrofóbicos (L, I, V) y ácidos (E, D) (Kotak *et al.*, 2004; Döring *et al.*, 2000; Nover *et al.*, 1997) en esta tesis se observó que las secuencias proteicas Hsfs de la clase A, tanto en *A. thaliana* como en *C. papaya* L. cv. SunUp, presentaron el dominio CTAD. En este se identificó AHA1 y AHA2, los cuales fueron marcados con rectángulos de color naranja y con asteriscos naranjas donde se encontraron aminoácidos conservados como en el caso de los aromáticos W y F así como ácidos E y los hidrofóbicos L, I y V, concordando de esta manera con la literatura reportada (figura II.2).

En relación a los 2 árboles filogenéticos obtenidos, cuando se realizó el primer árbol para las secuencias proteicas de *A. thaliana* (figura II.3) se formaron dos clados principales respaldados por valores de estimación de precisión bootstrap > 40, en el primer clado se encontraron secuencias de la clase A y C mientras que en el segundo, todas fueron de la clase B, esto es concordante con lo reportado por Nover (*et al.*, 2001), Nover y Scharf (1997), Nover (*et al.*, 1996).

Cuando se realizó el segundo árbol filogenético entre *A. thaliana* y *C. papaya* L. cv. SunUp, las secuencias Hsfs se agruparon en dos clados principales, los cuales presentaron valores de estimación de precisión bootstrap bajos (bootstrap < 40). Sin embargo en este árbol los valores de estimación de precisión bootstrap altos respaldaron la clasificación de las secuencias Hsfs en *Carica papaya* L. cv. SunUp.

Para elegir las secuencias del estudio de expresión durante el choque térmico, estudiadas en el Capítulo IV, se consultó la literatura. De los de 21 factores de transcripción de la familia Hsf en *A. thaliana* se sabe que los de la Clase A poseen el motivo AHA que promueve la activación transcripcional (Koskull- Döring *et al.*, 2007) mientras que los de la clase B y C no lo poseen (Kotak *et al.*, 2004) suponiendo así que los de la clase B y C no tienen actividad regulatoria de sí mismos y su función está relacionada a la represión y co-activación (Bharti *et al.*, 2004; Kotak *et al.*, 2004). Por ello para estudiar el estrés térmico por incremento de temperatura así como el tiempo de exposición en *C. papaya* L. cv. Maradol en esta tesis, se planteó incluir miembros de las tres clases para el estudio de la expresión de los genes hsf que codifican para factores transcripcionales Hsfs.

En tomate *Lycopersicon peruvianum* (reclasificado como *Solanum peruvianum*) el factor de transcripción denominado LpHsfA1a actúa como un regulador maestro de la respuesta al choque térmico, al regular la biosíntesis de otros factores de transcripción Hsfs como LpHsfA2 y LpHsfB1 así como la producción de proteínas Hsps manteniendo la termotolerancia y regresando la expresión de genes housekeeping después del estrés (recuperación) (Mishra *et al.*, 2002). Por ello se decidió incluir en esta tesis, el estudio de la expresión del gen hsfA1a en *C. papaya* L. cv. Maradol. Para la asignación del nombre, se consultó la matriz de distancia (o porcentaje de identidad) a través de las secuencias de aminoácidos, se eligió la secuencia identificada con el código "supercontig_90_16" (secuencia nucleotídica a través de la cual se predijo la secuencia de aminoácidos) y aunque presentó dos porcentajes de identidad muy similares 87.46 % (en relación a AtHsfA1a) y 87.40 % (en relación a AtHsfA1d) en esta tesis se eligió el mayor, designando a la proteína CpHsfA1a y al gen CphsfA1a, en este último caso con cierta reserva, pues el gen sólo podrá ser verificado mediante clonación y secuenciación (se propone como una perspectiva del capítulo IV).

En el árbol filogenético estos porcentajes quedan corroborados ya que esta secuencia se agrupó en el subclado 1 junto a las secuencias de *A. thaliana* AtHsfA1a y AtHsfA1d.

En la literatura se reporta que los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b en *A. thaliana* son los principales reguladores de la activación inmediata de la transcripción génica en el estrés del choque térmico y en consecuencia determinan la cinética de retroalimentación negativa, que es responsable de la temporalidad de la expresión génica (Lohmann *et al.*, 2004). Por esta razón se incluyó el estudio de la expresión del gen HsfA1b en *C. papaya* L. cv. SunUp. Para ello se consultó la matriz de distancia y se encontró que la secuencia con el código “supercontig_43_94” tuvo el mayor porcentaje de identidad con AtHsfA1b en *A. thaliana* (80.38 %). En el árbol filogenético esta secuencia se agrupó en el subclado 1 junto a las secuencias de *A. thaliana* AtHsfA1b y AtHsfA1e, en concordancia con lo visto en la matriz. Se designó a la proteína CpHsfA1b y al gen CphsfA1b.

En *Arabidopsis* el gen AthsfA2 se considera “tardío”, su expresión aumenta bajo estrés térmico, su respectivo factor de transcripción parece regular la expresión de un grupo de genes blanco que ampliamente se sobrelapan con aquellos regulados por los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b, (Wunderlich *et al.*, 2007). Schramm *et al.*, (2006) reportaron que AthsfA2 es el gen que se expresa con más fuerza de todos los heat shock factors y el que produce la proteína más estable posterior a la inducción del estrés térmico. Por esta razón también se incluyó el estudio de la expresión del gen hsfA2 en *C. papaya* L. cv. Maradol. Al revisar la matriz de distancia la secuencia con el código “supercontig_7_163” tuvo un porcentaje del 79.52 % con AthsfA2. Se designó a la proteína CpHsfA2 y al gen CphsfA2.

En relación a la clase B, en el genoma de *Arabidopsis* solo hay cinco genes hsfB dos de los cuales son considerados con funciones tempranas (AthsfB3 y AthsfB4) y los otros tres son considerados que actúan como hsfB tardíos (AthsfB1, AthsfB2a, AthsfB2b) (Schramm *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004) porque su expresión de ARNm se incrementa significativamente en el estrés térmico y hay pruebas de que esta expresión aumentada por el calor requiere la acción combinada de los hsfB tempranos de la clase A: AthsfA1a y AthsfA1b (Schramm *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004).

Para esta tesis se eligieron hsfB1 y hsfB2b para su estudio de expresión en *C. papaya* L. cv. Maradol, principalmente por su acción tardía es decir en etapas posteriores del estrés. La secuencia "supercontig_55_150" presentó el mayor porcentaje de identidad con AthsfB1 (72.37 %) y la secuencia "supercontig_74_64" con AthsfB2b (85.94 %), designado de esta manera las dos proteínas como CpHsfB1 y CpHsfB2b y los genes CphsfB1 y CphsfB2b. En el árbol ambas secuencias de aminoácidos se agruparon en el clado 4, CpHsfB1 efectivamente se agrupó con AtHsfB1 mientras que CpHsfB2b se agrupó con AtHsfB2b.

Un hecho más, para justificar la elección de estos dos miembros de la clase B es que en tomate el factor de transcripción LsHsfB1 actúa como coactivador de la transcripción mientras que en Arabidopsis AtHsfB1 es un represor transcripcional (Czarnecka-Verner *et al.*, 2004; Bharti *et al.*, 2004; Czarnecka-Verner *et al.*, 2000). En Arabidopsis, el gen AthsfB1 es el más fuertemente inducido por calor de los Hsfs clase B (Busch *et al.*, 2005).

Finalmente se decidió incluir a la clase C, que en el caso de *A. thaliana* es sólo un gen y su respectivo factor de transcripción. La secuencia con el mayor porcentaje de identidad a AtHsfC1 fue "supercontig_1780_1", el porcentaje fue 78.66 %, la designación a esta secuencia fue CpHsfC1 en el caso de la proteína y CphsfC1 para el gen. En clado 1, se puede observar que AtHsfC1 se agrupó con AtHsfC1.

Las secuencias restantes, que no se incluyeron para el estudio de la expresión pueden observarse en el cuadro II.3 y los nombres asignados a cada secuencia de aminoácidos fueron en la clase A: CpHsfA3 para "supercontig_5_77" en relación a AtHsfA4a (84.79 %), CpHsfA5 para el "supercontig_157_44" (73.28 %), CpHsfA5a al supercontig_27_46 (51.08 %), CpHsfA6b en el caso de supercontig_44_122 (72.70 %). El "supercontig_52_116" se nombró CpHsfA7a (82.92 %), "supercontig_2_169" como CpHsfA8 (76.91 %) y el "supercontig_28_162" como CpHsfA9 (70.90 %).

En el caso de la clase B se identificaron las siguientes secuencias: el supercontig_107_31 se nombró como CpHsfB2a con un porcentaje del 65.56 % en relación a AtHsfsB2a. El supercontig_224_10 se designó CpHsfB3 (75.99 %) y el "supercontig_49_32" fue CpHsfB4 (78.73 %).

II.5 CONCLUSIONES

En esta tesis se reporta por primera vez la caracterización *in silico*, identificación y relación filogenética de todos los miembros (proteínas Hsfs) de la familia heat shock factors dentro del genoma secuenciado en *C. papaya* L. cv. SunUp, que posiblemente están involucrados en la respuesta del choque térmico. De hecho en esta tesis, el estudio de la expresión de los genes hsfs en *C. papaya* L. cv. Maradol (capítulo IV) demostró su respuesta ante el estrés térmico.

De la revisión, en las 3 bases de datos, se encontraron 21 secuencias nucleotídicas hsfs en *A. thaliana*. Dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp, se encontraron 18 secuencias homólogas y éstas fueron respaldadas por porcentajes de identidad entre 62 % y 93 % y de similitud entre el 75 % y 100 % así como valores esperados entre $E= 10^{-28}$ y $E= 10^{-155}$. La presencia de miembros hsfs en *C. papaya* L. cv. SunUp es una evidencia más de su existencia conservada entre diversas especies estudiadas.

Se encontró un número menor de secuencias nucleotídicas hsfs homólogas dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp (18) en relación a *A. thaliana* (21) probablemente por la reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20% que presenta *C. papaya* L. en comparación con *A. thaliana*.

Las secuencias proteicas CpHsfs presentaron dominios conservados en relación a *A. thaliana* sin embargo a pesar de que se encontraron dominios muy conservados también se encontró cierta divergencia entre las secuencias.

Los dominios mejor conservados fueron el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de oligomerización (OD). En el caso del dominio DBD también se encontraron regiones correspondientes a las 4 láminas β antiparalelas y las 3 hélices α pertenecientes al motivo central hélice-giro-hélice (H2-T-H3), el cual es requerido para el reconocimiento específico del ADN y es común en proteínas involucradas en regulación de expresión génica.

El dominio de oligomerización, fue bipartito y con 2 regiones hepta-hidrofóbicas (HR) denominadas HR-A y HR-B, esenciales para la oligomerización y la formación de trímeros. Con esta evidencia bioinformática, se fundamenta que las secuencias presentadas en esta tesis corresponden a factores de transcripción Hsfs.

También se identificaron los residuos básicos K y R característicos de la señal de localización nuclear (NLS) esenciales para la importación nuclear. De igual forma se identificó la señal de exportación nuclear (NES), caracterizada por el aminoácido Leucina (L) en la región hidrofóbica HR-C.

Las proteínas Hsfs de la clase A presentaron el dominio de activación llamado CTAD, en este se identificó AHA1 y AHA2, caracterizados por aminoácidos conservados como en el caso de los aromáticos W y F así como ácidos E y los hidrofóbicos L, I y V. El motivo AHA es esencial para la función de la activación transcripcional.

A través del árbol filogenético se encontró que las 18 secuencias proteicas Hsfs de *C. papaya* L. cv. SunUp se agruparon con las 21 de *A. thaliana* en dos clados principales. Complementando esto con la matriz de distancia, se encontraron porcentajes de identidad con valores entre 51.08 % y 87.46 % y se asignaron los nombres más probables de las secuencias proteicas CpHsfs, encontrándose 12 en la clase A, 5 en la clase B y 1 en la clase C. En el primer clado se agruparon secuencias de la clase A y clase C mientras que en el segundo se agruparon secuencias de la clase B y de la clase A.

Para el estudio de la expresión de genes hsf en *C. papaya* L. cv. Maradol en el capítulo IV, se eligieron 6 genes representativos de las tres clases, cuyas secuencias proteicas presentaron los siguientes porcentajes de identidad en relación a *A. thaliana* en la matriz de distancia. En el caso de CpHsfA1a fue 87.46 %, CpHsfA1b (80.38 %), CpHsfA2 (79.52 %), CpHsfB1 (72.37 %), CpHsfB2b (85.94 %) y CphsfC1 78.66 %. El nombre fue corroborado por su agrupación con las secuencias proteicas Hsfs de *A. thaliana* dentro de los clados en el árbol filogenético. Finalmente a partir de secuencias nucleotídicas se diseñaron los oligonucleótidos que se utilizaron en los estudios de expresión presentados en el capítulo IV.

II.6 REFERENCIAS

- Agashe, V.R. y F.U. Hartl (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 11, 15–25.
- Akerfelt, M., Trouillet, D., V. Mezger y L. Sistonen (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1113, 15–27.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Baniwal, S. K; Bharti, K; Chan, K. Y; Fauth, M; Ganguli, A; Kotak, S; Mishra, S. K; Nover, L; Port, M; Scharf, K. D; Tripp, J; Weber, C; D. Zielinski y P. von Koskull-Döring (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*, 29, 471–487.
- Bharti, K., von Koskull-Döring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschl-Körbitzer, A., E. Treuter y L. Nover (2004). Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfB1 Represents a Novel Type of General Transcription Coactivator with a Histone-Like Motif Interacting with the Plant CREB Binding Protein Ortholog HAC1. *The Plant Cell*, 16, 1521–1535.
- Chan-Schaminet, KY; Baniwal, SK; Bublak, D; L. Nover y K-D. Scharf (2009) Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression. *J Biol Chem*, 284, 20848-20857.
- Chowdary, T.K., Raman, B., T. Ramakrishna y C.M. Rao (2004). Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity. *Biochem. J.* 381, 379–387.
- Cicero, M. P., Hubl, S. T., Harrison, C. J., Littlefield, O., J. A. Hardy y H. C. Nelson (2001) The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic Acids Res.*, 29, 1715–1723.
- Damberger, F. F., Pelton, J. G., Harrison, C J., H. C. Nelson y D. E. Wemmer (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.*, 3, 1806–1821.
- Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., A. Chen y L. Nover (2000) The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell*, 12, 265–278.
- EcuRed, 2010. *Arabidopsis* [Online] (actualizado 17 mayo 2009).
 Disponible:
<http://www.ecured.cu/index.php/Arabidopsis>
 [Acceso 8 enero de 2010].

FGENESH disponible en [http:// linux1.softberry.com/all.htm](http://linux1.softberry.com/all.htm))

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. 95/98/NT Disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Harrison, C. J., A. A. Bohm y H C. Nelson (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor; *Science* 263 224–227.

Heerklotz, D., Döring, P., Bonzelius, F., S. Winkelhaus y L. Nover (2001). The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2; *Mol. Cell. Biol.*, 21. 1759–1768.

Hewezi, T., M. Léger y L. Gentzbittel (2008). A Comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Gene Expression in Sunflower. *Annals of Botany*, 102, 127–140.

Kalendar, R., D. Lee y A. H. Schulman (2009). FastPCR Software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*. 3(1):1-14

Koskull-Döring , P., k. D. Scharf y L. Nover (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.*, 12, 452–457.

Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., F. Bicker y P. von Koskull-Döring (2004). Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant Journal*, 39(1), 98-112.

Liu, L., M. J. White y T. H. MacRae (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem*, 262, 247-257.

Lin, Y-X., Jiang, H.-Y., Chu, Z.-X., Tang, X.-L., S.-W. Zhu y B.-J. Cheng (2011). Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. *BMC Genomics*, 2011, 12:76.

Littlefield, O. y H. C. Nelson (1999). A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocystal; *Nature Struct. Biol.*, 6, 464–470.

Lyck, R., Harmening, U., Höhfeld I, K.-D. Scharf y L. Nover (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two tomato heat stress transcription factors; *Planta*, 202, 117–125.

Mattaj I. W. y L. Englmeier (1998). Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase; *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 265–306.

Ming, R., *et al.*, (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190), 991–996.

- Mishra, S. K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., L. Nover y K. D. Scharf (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HSFA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev*, 16, 1555–1567.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information [Online] (actualizado 28 de octubre de 2012). Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Acceso 30 de noviembre 2010].
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., A. Ganguli y K.-D. Scharf (2001). *Arabidopsis* and the Hsf world: How many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress Chap.*, 6, 177–189.
- Nover, L. y K-D. Scharf (1997). Heat stress proteins and transcription factors; *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 80–103.
- Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., E. Czarnicka-Verner y W.B. Gurley (1996). The Hsf world: Classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones*, 1, 215–223.
- Parsell, D.A. y S. Lindquist (1993). The function of heat shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437–496. Ritossa, F (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimentia*, 18, 571–573.
- Phytozome disponible en : [http// www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)
- Perez-Rodríguez, P., Riano-Pachon, D.M., Guedes, L., Rensing, S.A., B. Kersten y B. Mueller-Roerber (2009). PlnTFDB 3.0: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*.
- Schultheiss, J., Kunert, O., Gase, U., Scharf, K.-D., L. Nover y H. Rüterjans (1996). Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24. *Eur. J. Biochem.*, 236, 911–921.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A. Singh, S., Swing, V., Tissier, C., P. Zhang y E. Huala (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* 36,1009-1014.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., M. Nei y S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

- Tarora, K., Tamaki, M., Shudo, A., Urasaki, N., H. Matsumura y S. Adaniya (2010). Cloning of a heat stress transcription factor, CphsfB1, that is constitutively expressed in radicles and is heat-inducible in the leaves of *Carica papaya*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102, 69–77.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". *Nature* 408, 6814,796–815
- The Arabidopsis Information Resource, 2010. Gene families [Online] (actualizado 20 junio 2008).
Disponible:
<http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp>
[Acceso 8 enero de 2011].
- Thompson, J.D., 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.
- Vuister, G. W., Kim, S. J., Orosz, A., Marquardt, J., C. Wu y A. Bax (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor; *Nature Struct. Biol.*, 1, 605–614.
- Wang, C., Q. Zhang y H-X. Shou (2009). Identification and expression analysis of OsHsfs in rice. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10,4, 291-300.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 441–469.
- Xin, H., Zhang, H., Chen, L., Li, X., Lian, Q., Yuan, X., Hu, X., Cao, L., X. He y M. Yi (2010). Cloning and characterization of HsfA2 from Lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Rep*, 29, 875–885.
- Zhang, H., Jin, JP., Tang, L., Zhao, Y., Gu, X.C., G. Gao y J.C. Luo (2011). PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 39: D1114-D1117.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Q. W. Niu y N. H. Chua, (2006). "Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method". *Nat Protoc* 1 (2): 641–6.
- Zhang, Z., Schwartz, S., L. Wagner y W. Miller (2000). Agreedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational Biology*, 7, 203-214.
- Zhu, B., Ye, C., Lü, H., Chen, X., Chai, G., J. Chen y C. Wang (2006). Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, GmHsfA1, in soybeans (*Glycine max*). *J Plant Res*, 119:247–256.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR INCREMENTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE LA FISIOLOGÍA DE PLANTAS DE *C. papaya* L. cv. Maradol

III.1 INTRODUCCIÓN

Los cambios térmicos, vinculados a ambientes cálidos alteran las temperaturas del aire, y del suelo, así como en el contenido de agua de este último, afectando a las plantas, por ser organismos sésiles (Loik *et al.*, 2000). El aumento de temperatura, 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 expansión de hojas, incluso abscisión foliar, cierre de estomas; afectación al desarrollo de sistemas reticulares, la velocidad a la que absorben agua y nutrientes las raíces, la floración y por lo tanto el rendimiento. También pueden facilitar la existencia de insectos y enfermedades (Hewezi *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2002; Betts, 1997; Wild, 1992).

En tomate (*Solanum lycopersicum*) el calor afecta el desarrollo tanto en polen como en anteras y por lo tanto reducción de frutos (Sato *et al.*, 2000; Peet *et al.*, 1998). En frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cuando se aplica calor antes de la antesis resulta en mal formación de polen y anteras (Porch y Jahn, 2001). En plantas de lino (*Linum usitatissimum*), el calor aplicado después iniciar la floración afectó la capacidad reproductiva, los frutos pesaron menos que los frutos de las plantas control y con tres veces más posibilidades de ser malformados y con semillas estériles (Cross *et al.*, 2006).

En *Carica papaya* L. (Caricaceae) la temperatura óptima de germinación es 30 °C (Gil y Miranda, 2008) mientras que la temperatura para su crecimiento está entre 21 °C y 33 °C, siendo el óptimo entre 23 °C y 26 °C (Nakasone y Paull, 1998) a temperaturas mayores de 35 °C las flores hermafroditas pueden deformarse en flores con partes femeninas no funcionales o pobremente desarrolladas, abscisión floral, menor producción de frutos y quemaduras en hojas (AGOGTR, 2008).

La fotosíntesis es un proceso fundamental, por el cual las plantas acumulan biomasa por la conversión de carbono inorgánico a carbohidratos usando la energía de la luz (Richards, 2000) sin embargo su inhibición es común en las plantas expuestas periódicamente a estrés térmico, en especial cuando la temperatura es superior a 45°C (Camejo *et al.*, 2005) con esta temperatura, el fotosistema II (PSII) puede dañarse fácilmente (Gomos *et al.*, 1994).

Una manera de conocer la existencia o ausencia de daño al aparato fotosintético es a través de mediciones de eficiencia del fotosistema II, ya que es considerado el componente más sensible al calor de dicho aparato, principalmente en el transporte de electrones; una estrategia usual para medir la eficiencia del fotosistema II es a través del análisis de la emisión de la fluorescencia de la clorofila a y con ello caracterizar el efecto y modo de acción del estrés térmico. Este método de análisis puede usarse como un buen indicador de daño y es aplicable a plantas de manera no destructiva, no invasivo, rápido y sensible (González *et al.*, 2008).

También las temperaturas elevadas entre 35 °C y 45 °C causan fuga de iones en la membrana tilacoides de los cloroplastos (donde está localizado el fotosistema II) e induce transferencia cíclica de electrones; el daño a nivel celular puede ser explicado por la pérdida de estabilidad de la membrana, ya que es afectada durante el estrés por altas temperaturas cuando disminuye la fuerza de los puentes de hidrógeno y de las interacciones electrostáticas entre los grupos polares de las proteínas en fase acuosa de la membrana (González *et al.*, 2008).

Las altas temperaturas, alteran la estructura y composición de la membrana y provocan la pérdida de iones, dicha alteración está relacionada con la inhibición de procesos como la fotosíntesis y la respiración, que dependen de la actividad de enzimas y proteínas transportadoras de electrones asociadas a la membrana, las cuales son menos estables o se desnaturalizan a temperaturas elevadas. El daño a la membrana parece ser el principal causante de tal inhibición ya que las temperaturas para desnaturalizar las proteínas implicadas en fotosíntesis y respiración son mayores a las que se producen el daño membranal (Taiz y Zeiger, 1998).

En zonas tropicales, como la península de Yucatán, es común el registro de temperaturas altas, generando pérdidas en los cultivos, entre estos el de *C. papaya* L. cv. Maradol. Según los datos meteorológicos CONAGUA (2013) mayo es el mes en el que se registran las temperaturas más altas en el Estado de Yucatán, el máximo histórico para Mérida, la capital del Estado fue el 27 de mayo de 2009 con 43.5 °C y el registro histórico para el Estado fue de 47 °C en San Diego Buenavista, una comisaría del municipio de Tekax , el 16 de mayo de 2005. Es común el registro de temperaturas entre 40 °C y 45 °C en municipios como Abalá, Acanceh, Chunchucmil, Halachó, Motul, Ticul y Tekax.

En este capítulo se diseñaron experimentos para estudiar el efecto de las temperaturas altas, tomando como referencia las temperaturas más elevadas de los meses más calurosos en el Estado de Yucatán. Se determinó el punto de estrés térmico (estrés severo) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a diversas temperaturas y diversos tiempos de exposición. A partir del punto de estrés térmico se caracterizó el efecto de altas temperaturas en condiciones de estrés moderado, en el punto de estrés térmico así como en el post estrés a partir de diversos parámetros fisiológicos como la eficiencia de fotosistema II, conductancia estomática, la integridad de la membrana (fuga de iones), el contenido relativo de agua y contenido de pigmentos.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 Diseño de la cámara térmica

La cámara térmica (figura III.1) se diseñó en forma rectangular (60 de largo x 40 de altura x 30 de ancho) las paredes fueron de cristal (2 mm de espesor), la fuente calorífica consistió de una resistencia eléctrica de 100 watts dentro de una caja de aluminio en cuyo extremo se colocó un ventilador con la finalidad de homogeneizar el aire caliente en toda la caja. Para controlar la temperatura se instaló un termostato (Saginomiya, Seisakusho INC, Japan) cuyo intervalo de sensado se encontró en el rango de -10 °C a 50 °C \pm 2 °C.

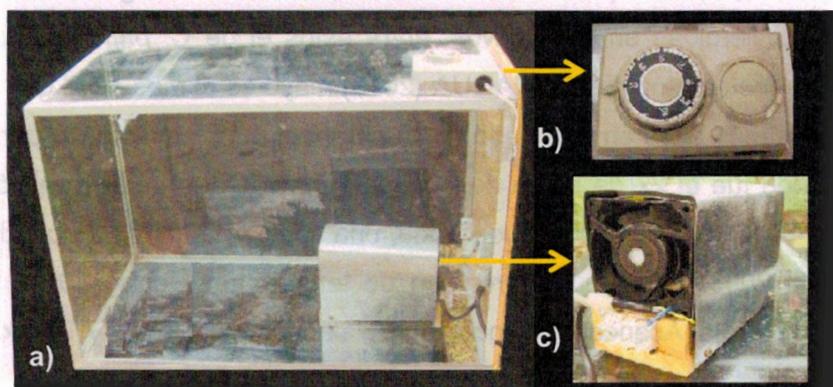


Figura III.1 Cámara térmica. a) El diseño de la cámara térmica fue rectangular y el material consistió en cristal de 2 mm de espesor, en la parte superior y por fuera se colocó el termostato mientras que en la parte interior se colocó la resistencia eléctrica. b) Se muestra el termostato con un rango de temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. c) La resistencia eléctrica se encontró dentro de una caja de aluminio con la intención de darle dirección al aire caliente, en un extremo se colocó el ventilador mientras que el otro extremo permaneció abierto para la salida del aire.

III.2.2 Material vegetal

III.2.2.1 Germinación y edad fisiológica

Cada semilla, de plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol, fue germinada a 1 cm de profundidad, en vasos de unicel (8 cm de diámetro y 11 cm de altura) utilizando como sustrato agrolita y peat moss (1:1). Dentro del invernadero (figura III.2a), se dispuso de una cámara de germinación protegida con malla antiáfidos, temperatura promedio de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, densidad de flujo de fotones promedio de $60\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y humedad relativa del 80 % (figura III.2b).

Cuando las plantas alcanzaron una edad de 65 días y una altura aproximada de 18 cm fueron transferidas y aclimatadas durante 5 días en un cuarto de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ día/noche, fotoperíodo de 12 h, densidad de flujo de fotones de $60\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y humedad relativa del 80 % (figura III.2c).

El riego consistió de 10 ml de agua destilada cada tercer día durante los primeros 25 días, mientras que el tiempo restante, el riego fue de 15 ml cada segundo día, de una solución (1ml/L) nutritiva comercial (Bayfolan®Forte líquido, Bayer).

El término fisiológico que mejor caracterizó a las plantas usadas después de la aclimatación, fue el de plantas jóvenes (70 días) en relación al tejido vegetal colectado de plantas adultas para el respectivo análisis molecular de expresión basal (Capítulo IV). Se determinó no utilizar el término plántula, ya que éste solo abarca un período de desarrollo que inicia a partir de que la semilla sale de su dormancia y germina; finaliza cuando desarrolla sus primeras hojas no cotiledonares. Una plántula típica consiste de tres partes principales: raíz embrionaria (radícula), tallo embrionario (hipocótilo) cotiledones, además de una o dos de sus hojas verdaderas.

A los 70 días las plantas jóvenes tuvieron varias hojas verdaderas y suficiente tejido para los análisis fisiológicos, éstos se llevaron a cabo en el estrato medio de las plantas jóvenes donde se situaron las hojas más jóvenes completamente expandidas, esto fue en el 7° y 8° nudo incluyendo en el conteo a los cotiledones desde abajo hacia arriba. Cuando se cortó la raíz, se le retiró el sustrato con agua destilada y la muestra se tomó de la parte media de ésta.

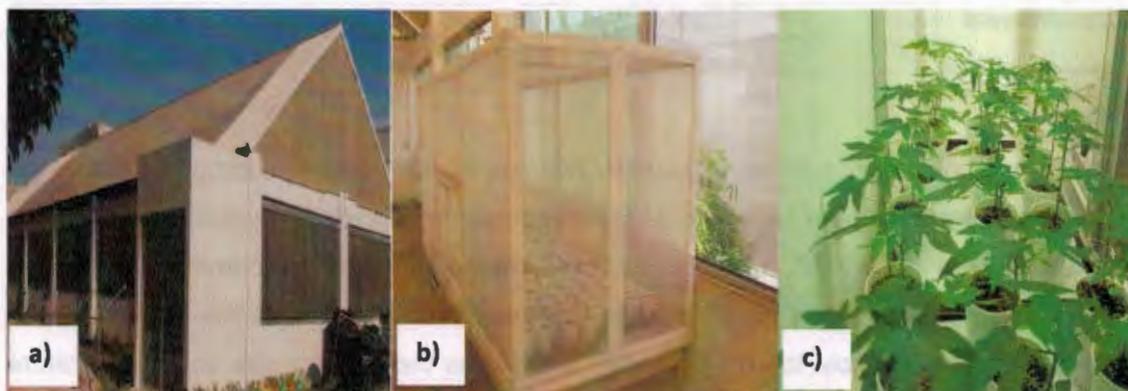


Figura III.2 Proceso de germinación y aclimatación de las plantas de *Carica papaya* L. cv. Maradol. **a)** Invernadero en el CICY. **b)** Caja con malla de protección dentro del invernadero. **c)** Plantas jóvenes de *Carica papaya* L. cv. Maradol a los 65 días, en el inicio del período de aclimatación dentro del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular.

III.2.3 Experimentos

III.2.3.1 Determinación del punto de estrés térmico

Con la finalidad de encontrar el punto de estrés térmico (punto estresante) en las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol, se realizó un experimento evaluando 12 exposiciones cuyas variables fueron temperatura y tiempo. Las temperaturas evaluadas fueron 3 (30 °C, 40 °C y 50 °C) mientras los tiempos de exposición fueron 4 (1 h, 2 h, 4 h y 8 h); la temperatura control del experimento fue de 25 °C. A partir de las plantas jóvenes previamente aclimatadas, se eligieron 80 al azar y se formaron dos grupos principales: el grupo control y el grupo experimental (cuadro III.1). Esto fue para una repetición, se realizaron en total 3 repeticiones.

Cuadro III.1 Grupos y subgrupos formados con plantas jóvenes de *Carica papaya* cv Maradol para la determinación del punto de estrés térmico, evaluando distintas temperaturas y diferentes tiempos de exposición.

	Temperatura (°C)	Tiempo de exposición (horas)			
		1	2	4	8
Grupo control	25	Subgrupo I	Subgrupo V	Subgrupo IX	Subgrupo XIII
Grupo experimental	30	Subgrupo II	Subgrupo VI	Subgrupo X	Subgrupo XIV
	40	Subgrupo III	Subgrupo VII	Subgrupo XI	Subgrupo XV
	50	Subgrupo IV	Subgrupo VIII	Subgrupo XII	Subgrupo XVI

Con el grupo control (un total de 20 plantas jóvenes) se formaron 4 subgrupos y fueron los respectivos controles para cada uno de los 4 tiempos de exposición evaluados, los cuales se mantuvieron a 25 °C durante todo el transcurso del experimento; el grupo experimental, se formó con las 60 plantas jóvenes restantes aclimatadas a 25 °C, y fue dividido en 12 subgrupos, los cuales fueron expuestos cada uno a una sola temperatura (choque térmico) por cada tiempo de exposición, dentro de la cámara térmica. Por ejemplo cuando se evaluó la exposición a las 3 diferentes temperaturas, que consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h de exposición y su respectivo control se utilizaron los subgrupos I, II, III y IV, mientras que la exposición durante 2 h se conformó con los subgrupos V, VI, VII y VIII y así sucesivamente con las exposiciones durante 4 h y 8 h.

Para conseguir el choque térmico, la cámara alcanzó previamente la temperatura que iba a ser evaluada, evitando la aclimatación de las plantas, la cual hubiera sucedido, si primero se introducía el subgrupo y luego la cámara alcanzaba la temperatura deseada. Al término de cada choque térmico, las plantas jóvenes fueron regresadas a 25 °C, para evaluar etapas posteriores a la exposición térmica es decir en "estado de recuperación", el término usado en la literatura científica en el idioma inglés para describir este estado es "recovery" así que se usó la traducción literal: recuperación, para referirnos a lo largo de toda la tesis, a la etapa que indica que las plantas fueron regresadas a condiciones iniciales una vez concluida cada exposición (temperatura y tiempo evaluados).

Por cada una de las 3 repeticiones cada subgrupo consistió en 5 plantas jóvenes (5 réplicas) y las mediciones realizadas consistieron en fluorescencia de clorofila (F_v/F_m) y conductancia estomática (g_s); éstas se realizaron en 5 momentos: a) antes de cada exposición (25 °C), b) al término de cada exposición (sin sacarlas de la cámara térmica), c) 1 h, 2 h, 4 h u 8 h (según el tiempo de exposición evaluado) en recuperación, d) 24 h de recuperación y e) 1 semana de recuperación. Las mediciones en etapas posteriores (recuperación) a cada exposición, se realizaron con la finalidad de buscar o en su caso encontrar el punto estresante en etapas de recuperación, ya que muchas de las afectaciones fisiológicas no son inmediatas.

III.2.3.2 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación

En este experimento no se evaluaron distintos tiempos de recuperación, la finalidad fue caracterizar el efecto térmico al término de la exposición a tres diferentes temperaturas con duración de 1 h y en base a la determinación del punto de estrés térmico se asumió como la condición de estrés moderado. Un nuevo lote de plantas jóvenes (un total de 20), se aclimataron previamente a 25 °C, para formar 4 grupos. Un grupo sirvió como control manteniéndose a 25 °C mientras que los 3 grupos restantes fueron los experimentales, se expuso cada uno, a una sola temperatura dentro de la cámara térmica durante 1 h. Para conseguir el choque térmico las temperaturas dentro de la cámara, al momento de introducir cada grupo, fueron 30 °C, 40 °C ó 50 °C respectivamente. Esto fue para una repetición, se realizaron un total de 3 repeticiones.

Por cada una de las 3 repeticiones cada grupo consistió de 5 plantas jóvenes (5 réplicas) y las mediciones consistieron en fluorescencia de clorofila y conductancia estomática. Se colectaron en la parte media de cada planta 4 discos de hoja para la medición de fuga de iones (2 discos) y contenido relativo de agua (2 discos). Para la determinación posterior del contenido de pigmentos se colectaron 4 tejidos: hoja, peciolo, tallo y raíz, los cuales fueron depositados en bolsas de papel aluminio y por separado, éstos se guardaron en ultra congelador a -80. En el grupo control, las mediciones y colectas se realizaron a 25 °C mientras que en los grupos experimentales fueron al término de cada exposición, sin sacar las plantas de la cámara, es decir sin regresar a 25 °C (sin recuperación).

III.2.3.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación

En base a la determinación del punto de estrés térmico, este experimento se realizó con la finalidad de caracterizar la condición de estrés severo y post estrés (recuperación). Un tercer lote de plantas jóvenes (un total de 15), se aclimataron previamente a 25 °C, para formar 3 grupos; un grupo se mantuvo a 25 °C como control, los 2 grupos restantes fueron los experimentales, se introdujeron durante 4 h en la cámara térmica la cual tenía una temperatura previa de 50 °C, para evitar la aclimatación. Después de concluir el tratamiento las plantas jóvenes se regresaron a 25 °C (recuperación). Esto fue para una repetición, se realizaron un total de 3 repeticiones.

Por cada una de las 3 repeticiones cada grupo consistió de 5 plantas jóvenes y las mediciones consistieron en fluorescencia de clorofila y conductancia estomática. Se colectaron en la parte media de cada planta 4 discos de hoja para la medición de fuga de iones (2 discos) y contenido relativo de agua (2 discos). Para la determinación del contenido de pigmentos se colectaron 4 tejidos: hoja, peciolo, tallo y raíz, los cuales fueron depositados en bolsas de papel aluminio y por separado, éstos se guardaron en ultra congelador a -80 °C. En el grupo control, las mediciones y colectas se realizaron en plantas que permanecieron a 25 °C mientras que en los grupos experimentales éstas se realizaron después de las exposiciones, en un grupo a las 4 h de recuperación (estrés severo) y en el grupo restante se realizaron 1 semana después de recuperación (post estrés).

III.2.4 Análisis fisiológico

III.2.4.1 Fluorescencia de clorofila a

Estas mediciones se realizaron mediante 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 30 min. La exposición de luz fue en la parte adaxial de la hoja y consistió de un pulso de saturación de $3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (100 %) durante 2 seg. Con estas lecturas se determinó el cociente de fluorescencia variable (Fv) sobre fluorescencia máxima (Fm), F_v/F_m ; que se ha definido como una medida de la eficiencia fotoquímica y como un criterio del nivel de estrés al que se encuentra expuesta una planta (Willits y Peet, 2001; Maxwell y Johnson, 2000).

III.2.4.2 Conductancia estomática

Las lecturas se realizaron en la parte adaxial de la hoja mediante un porómetro EGM-4 (PP systems, Hitchins, UK). La cámara del porómetro se sujetó a una sola hoja, por cada planta. Ésta fue estabilizada durante 1 min y al término se tomó la lectura.

III.2.4.3 Fuga de iones

Se utilizó un sacabocado del número 9 (1 cm de diámetro) para realizar cortes en forma circular (disco) en la parte suave de la hoja (evitando nervadura); por cada planta se sacaron 2 discos de una misma hoja, los cuales se colocaron en 10 ml de agua destilada.

Se incubó y agitó por 4 h, seguidamente se midió la conductividad inicial (C 1) y se colocó en autoclave (10 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: $\text{Fuga de iones} = (C 1 / C 2) \times 100 \%$. Se utilizaron los protocolos de Clarke (*et al.*, 2004), Lu (*et al.*, 2003) y Bajji (*et al.*, 2001), modificados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular.

III.2.4.4 Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula $CRA = (PF - PT) / (PF - PS)$. Donde PF es el peso fresco del tejido, PT es el peso turgente (rehidratado); PS es el peso seco del tejido después de haberse eliminado el agua del mismo. Se utilizó un sacabocado del número 9 (1 cm de diámetro) para realizar cortes en forma circular (disco) en la parte suave de la hoja (evitando nervadura); por cada planta se sacaron 2 discos, de una misma hoja; cada disco se pesó (PF), luego se suspendieron en agua (sin sumergir) y se dejó reposar a luz tenue y baja temperatura (25 °C) por 24 h. Se pesó de nuevo (PT) retirando el exceso de agua; se liofilizó y pesó de nuevo (PS), según el protocolo de Smart y Bingham (1975) modificado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular.

III.2.4.5 Determinación del contenido de pigmentos

El contenido de clorofilas totales, clorofila a, clorofila b y carotenoides se determinó a partir de 0.05 g de cada uno de los tejidos evaluados: hoja, peciolo, tallo y raíz. Se utilizó el protocolo de Arnon (1949) con acetona al 80 %, estandarizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, mientras que las fórmulas se calcularon en base a las ecuaciones de Welburn (*et al.*, 1994). Las lecturas de absorbancia fueron hechas en el espectrofotómetro de luz UV visible (DU 650 Beckman Coulter, USA).

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Diseño de la cámara térmica

A continuación se muestran las mediciones de temperatura dentro de la cámara térmica que se diseñó para esta tesis (figura III.3). El control preciso de temperatura se logró gracias al termostato (Saginomiya, Seisakusho INC, Japan) el cual tiene un intervalo de sensado de -10 °C a 50 °C con un error de ± 2 °C. Las mediciones se realizaron con un sensor data logger (WatchDog® modelo 450) para documentar que la temperatura se alcanzó rápidamente y se mantuvo estable.

Por cuestiones logísticas la cámara se encontró dentro del cuarto de cultivo del laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, el lugar donde se aclimataron las plantas previamente germinadas en el invernadero del CICY. Partiendo de la temperatura de 25 °C a la que se encontró en todo momento el cuarto de cultivo, la temperatura de 30 °C se alcanzó a los 10 min y se puede ver en la gráfica que la temperatura se logró mantener estable desde 1 h (60 min) hasta 8 h (480 min). La temperatura de 40 °C se alcanzó a los 30 min mientras que la de 50 °C se alcanzó a 1 h (60 min), en ambos casos, la temperatura fue estable aún a una duración de 8 h.

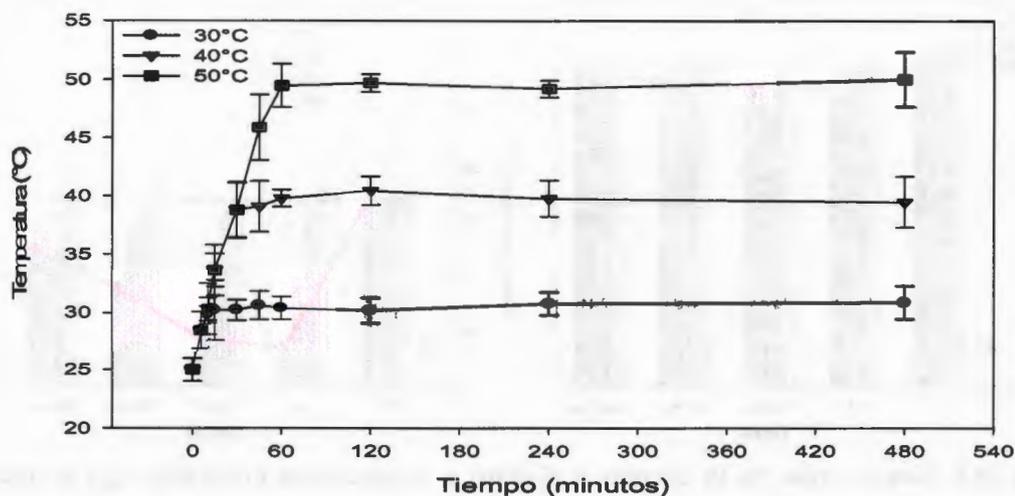


Figura III.3 Mediciones de verificación realizadas en la cámara térmica. La cámara se colocó dentro del cuarto de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, cuya temperatura fue de 25 °C ± 1 °C día/noche. n= 12 por cada punto de medición. Media ± DE.

III.3.2 Determinación del punto de estrés térmico

La determinación del punto de estrés térmico, se realizó en base a 2 parámetros: fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) y en un solo tejido (hoja). Cuando se evaluó la exposición de las plantas jóvenes de 70 días de edad a cada temperatura (30 °C, 40 °C o 50 °C) durante 1 h, se pudo observar que el valor de Fv/Fm disminuyó pero se mantuvo cercano a 0.80 en las distintas mediciones realizadas así como en las plantas mantenidas a temperatura control (25 °C) (figura III.4a).

La conductancia estomática, en las plantas expuestas durante 1 h a las tres temperaturas evaluadas, se redujo al término de 1 h de exposición y a 1 h y 24 h después de concluir cada exposición y regresarlas a 25 °C (recuperación) particularmente a 50 °C, en comparación con las plantas mantenidas en la temperatura control o bien comparado con al tiempo cero (antes de cada exposición). A 1 semana en recuperación los niveles de conductancia aumentaron en comparación con las mediciones a 24 h de recuperación, pero en ningún caso el incremento ascendió a valores iniciales (figura III.4b).

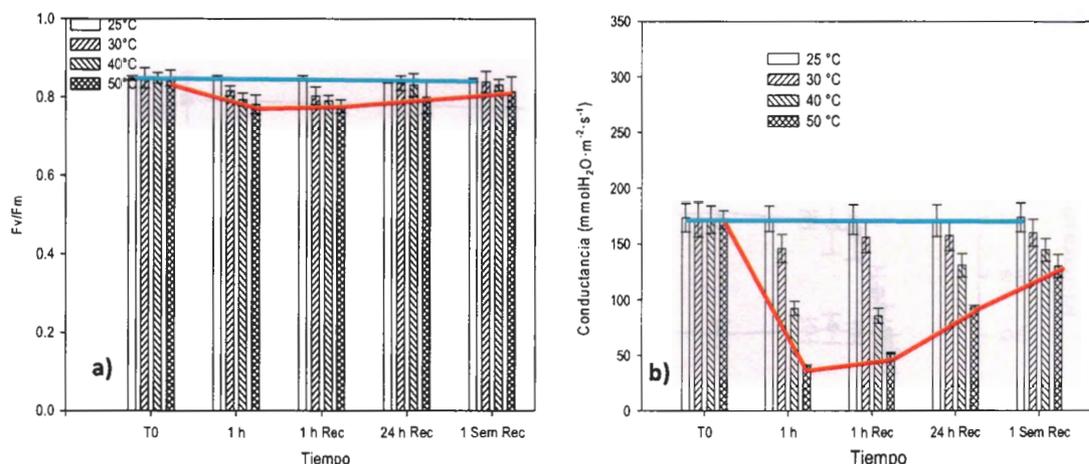


Figura III.4 Fluorescencia de la clorofila a (F_v/F_m) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 1 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (1 h de exposición), 1 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes temperaturas: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja).

En las plantas jóvenes expuestas durante 2 h a las 3 diferentes temperaturas, se se observó que el valor de F_v/F_m descendió a una temperatura de 50 °C en especial cuando se realizaron las mediciones al término de las 2 h de exposición y 2 h de recuperación respectivamente. Sin embargo después de 1 semana de recuperación, el valor se encontró cercano a 0.80 en todas las temperaturas evaluadas (figura III.5a).

Las plantas jóvenes expuestas a 30 °C presentaron la conductancia estomática con menor afectación en cada una de las mediciones realizadas. Mientras que las mayores afectaciones se registraron al término de las 2 h de exposición, 2 h de recuperación y 24 h de recuperación tanto en plantas expuestas a 40 °C como a 50 °C (figura III.5b). Sin embargo a 1 semana de recuperación las plantas jóvenes expuestas a 50 °C fueron las más afectadas respecto a las expuestas a 30 °C y 40 °C.

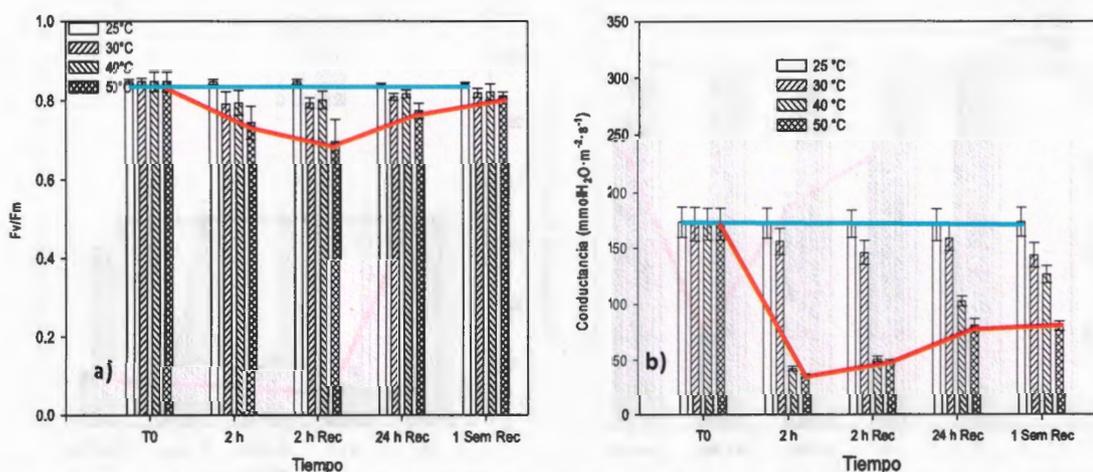


Figura III.5 Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 2 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (2 h de exposición), 2 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes tratamientos: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja).

En las plantas jóvenes expuestas durante 4 h, la mayor afectación en Fv/Fm fue a 50 °C en comparación con las plantas mantenidas a temperatura control (25 °C) y las expuestas a 30 °C y 40 °C, se notó desde el término del tratamiento (4 h de exposición) y a 4 h de recuperación mientras que la mayor afectación fue a las 24 h de recuperación. Después de 1 semana de recuperación el valor de Fv/Fm en plantas expuestas a 50 °C ascendió pero sin llegar al nivel observado a 25 °C y las expuestas a 30 °C y 40 °C (figura III.6a).

La conductancia, disminuyó en todas las temperaturas evaluadas al término de la exposición y este patrón se mantuvo a las 4 h de recuperación. Sin embargo las plantas jóvenes que fueron expuestas a 30 °C y 40 °C mostraron un incremento a partir de 24 h de recuperación mientras que en las plantas expuestas a 50 °C, su conductancia se mantuvo baja tanto después de 24 h y 1 semana de recuperación (figura III.6b).

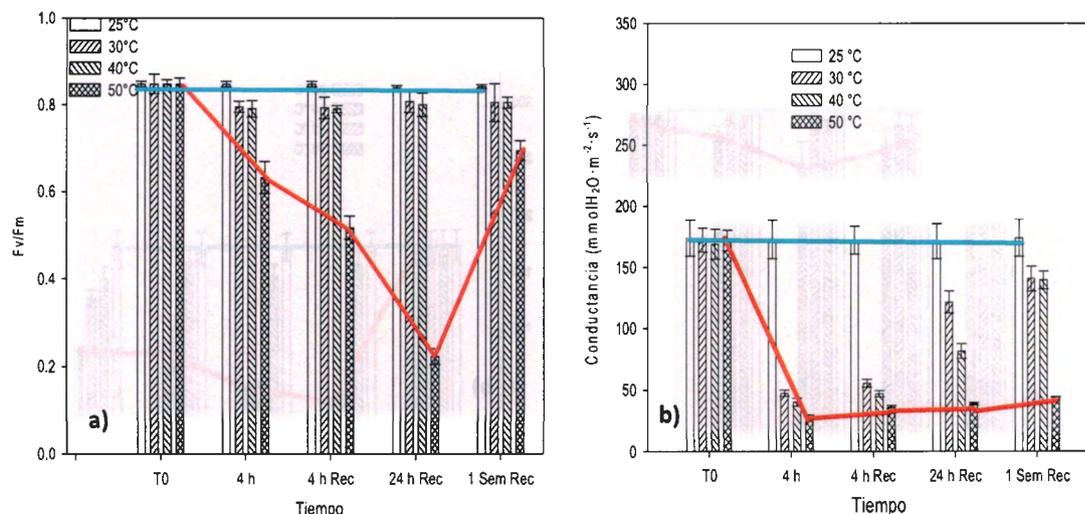


Figura III.6 Fluorescencia de la clorofila a (F_v/F_m) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 4 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (4 h de exposición), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes tratamientos: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja).

De todas las temperaturas y tiempos de exposición evaluados, solo en las plantas expuestas a 50 °C durante 4 h presentaron caída de hojas después de 1 semana de recuperación, por lo que se llevó a cabo un registro fotográfico (figuras III.7a-e). Las hojas con mayor edad (estrato inferior) y estrato medio presentaron coloración amarilla y abscisión, provocando que las plantas se quedaran con algunas hojas, en particular las más jóvenes del estrato superior. Esto puede verse en la figura III.7e.



Figura III.7 Plantas jóvenes de *Carica papaya* L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 4 h. **a)** Planta mantenida a 25 °C (Control). **b)** planta al término de 4 h de exposición a 50 °C, **c)** planta vista a las 4 h de recuperación, **d)** planta después de 24 h de recuperación y **e)** planta vista después de 1 semana de recuperación, se puede observar la abscisión de hojas.

También se le dió seguimiento al fenómeno de abscisión observado, en plantas expuestas a 50 °C durante 4 h aún hasta 10 días de haber sido regresadas a 25 °C (recuperación), (figura III.8). Aunque fue bastante contrastante la afectación en hojas de las plantas expuestas a 50 °C después de 1 semana de recuperación en comparación con las plantas mantenidas a 25 °C (figura III.7a y figura III.7e vistas anteriormente), la afectación fue mayor a los 10 días de recuperación (figura III.8b) y fue el punto en que las hojas dejaron de caerse y las hojas más jóvenes se mantuvieron adheridas a la planta y nuevos brotes comenzaron a surgir.

En las plantas vistas después de 1 semana de recuperación la caída de hojas fue de cerca de la mitad de éstas (42 % de hojas caídas) mientras que a los 10 días de recuperación fue más crítico (75 % de hojas caídas).

Cuando el tiempo de exposición consistió en 8 h a las tres diferentes temperaturas, los valores de F_v/F_m (figura III.9a) y conductancia estomática (figura III.9b) descendieron drásticamente en las plantas expuestas a 50 °C.

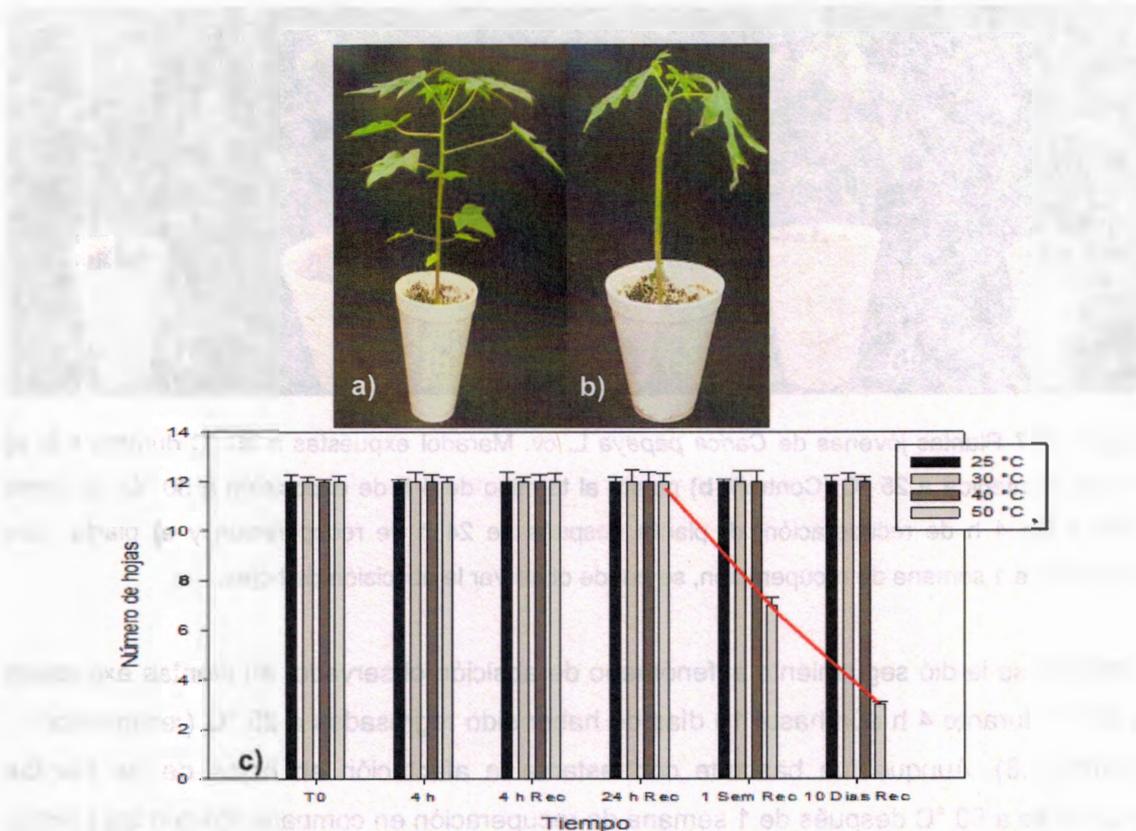


Figura III.8 Abscisión de hojas en plantas jóvenes de *Carica papaya* L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 4 h. a) Planta mantenida a 25 °C (control). b) planta expuesta a 50 °C durante 4 h vista después de 10 días de recuperación, puede observarse que las hojas de mayor edad se han caído (75 %), la planta aún sigue viva y con nuevos brotes (ápice o zona apical). c) Gráfica correspondiente al conteo de hojas en plantas expuestas durante 4 h a 30 °C, 40 °C y 50 °C, desde el inicio del tratamiento hasta 10 días de recuperación. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señala la mayor temperatura en línea roja (50 °C).

La disminución drástica de F_v/F_m y conductancia estomática en las plantas expuestas a 50 °C, hasta valores cercanos a cero, cuando se realizó la medición al término de 8 h de exposición, 8 h de recuperación, 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación sugieren un daño irreversible a dicha temperatura y tiempo de exposición. Mientras que en las plantas expuestas a 30 °C y 40 °C, la afectación en F_v/F_m fue poca y aunque la conductancia estomática disminuyó en las plantas expuestas a las 3 diferentes temperaturas, ésta se incrementó después de 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en las temperaturas de 30 °C y 40 °C, sin llegar a valores iniciales.

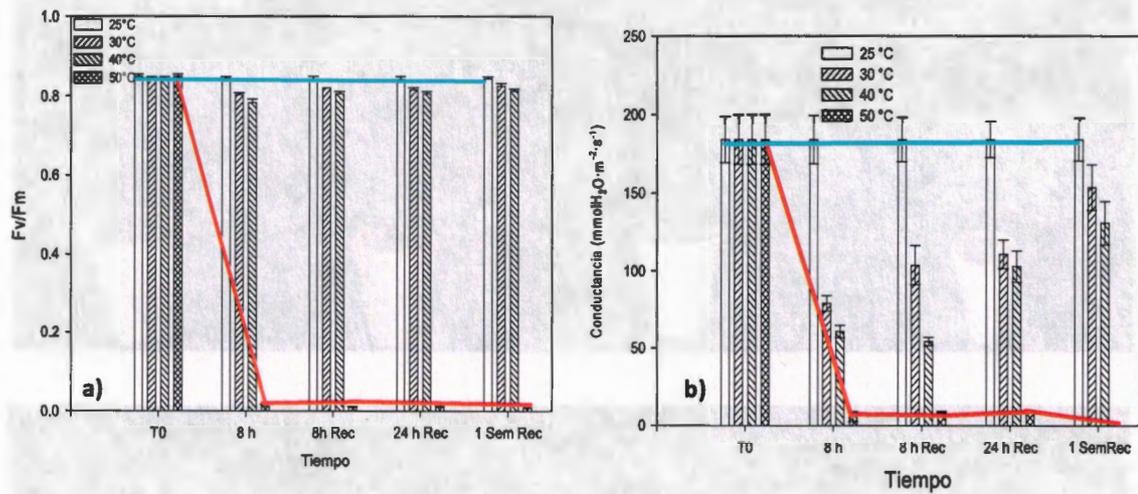


Figura III.9 Fluorescencia de la clorofila a (F_v/F_m) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición de 3 diferentes temperaturas durante 8 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), al término de la exposición al calor (8 h de exposición), 1 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación), 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación en tres diferentes tratamientos: 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente. Las plantas usadas como control fueron mantenidas a una temperatura de 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE. Se señalan las temperaturas contrastantes: 25 °C (línea azul) y 50 °C (línea roja).

En la figura III.10 se pueden ver las fotografías de las plantas expuestas a las 3 temperaturas durante 8 h, con su respectivo control (planta mantenida a 25 °C), al término de las 8 h de exposición (figuras III.10a-d) y después de 1 semana de recuperación (figuras III.10e-h). Tanto al término de 8 h de exposición como después de 1 semana de recuperación, las plantas expuestas a 30 °C y 40 °C no se vieron tan afectadas como las expuestas a 50 °C al término de las 8 h de exposición (figura III.10d) sin embargo la afectación fue contundente en las plantas expuestas a 50 °C después de 1 semana de recuperación (figura III.10h).

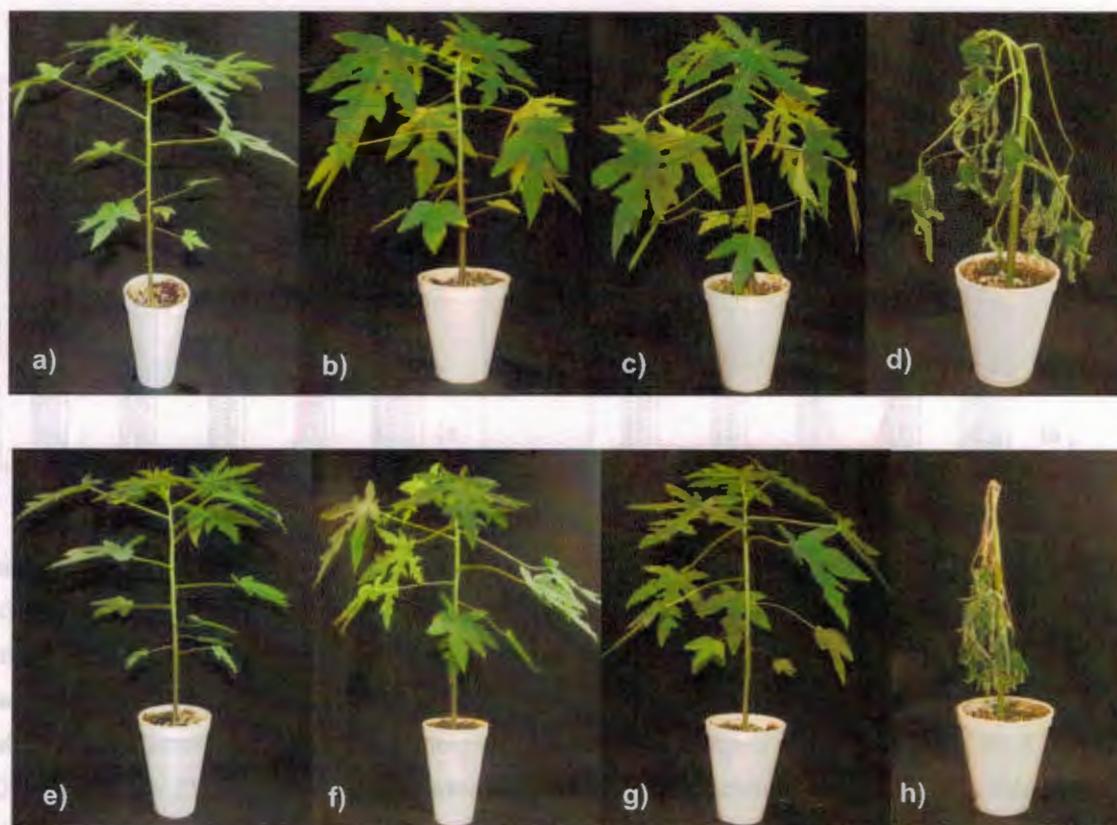


Figura III.10 Plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 3 diferentes temperaturas durante 8 h. **a)** Planta mantenida a 25 °C. Las figuras **b)**, **c)** y **d)** corresponden a las plantas al término de las 8 h de exposición a 30 °C 40 °C y 50 °C respectivamente. **e)** planta mantenida a 25 °C después de 1 semana. **f)**, **g)** y **h)** son las plantas que se expusieron a 30 °C 40 °C y 50 °C respectivamente durante 8 h, vistas después de 1 semana de recuperación (regresadas a 25 °C).

Ya que la afectación fue muy evidente en las plantas expuestas a 50 °C durante 8 h, se le dio continuidad al registro fotográfico después de dos semanas de recuperación; a diferencia de lo ocurrido a los 10 días de recuperación en las plantas expuestas a 50 °C durante 4 h donde se observó la caída de la mayor parte de las hojas pero con nuevos brotes en la parte superior (parte apical) (figura III.8b) en las plantas expuestas a 50 °C durante 8 h, no se observaron signos de mejoría aún a las dos semanas de recuperación (figura III.11a), en éstas no hubo caída de hojas, las hojas se deshidrataron pero en todo momento permanecieron adheridas a las plantas a través del peciolo también deshidratado. Cuando a las plantas se les retiró el sustrato pudo observarse pudrición en la raíz principal y ausencia de raíces secundarias (figura III.11b).

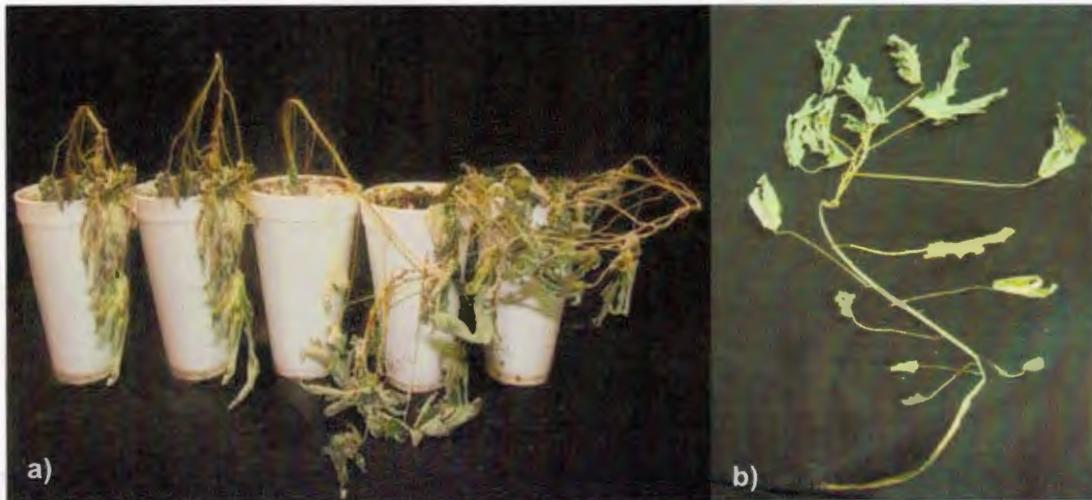


Figura III.11 Plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 8 horas. **a)** Plantas jóvenes vistas a las dos semanas de recuperación, el 100% se murieron, puede observarse que las plantas muertas conservaron las hojas, totalmente deshidratadas al igual que el resto de la planta. **b)** la raíz principal presentó pudrición y ausencia de raíces secundarias.

III.3.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación

Cuando las plantas se expusieron durante 1 h a temperaturas de 30 °C, 40 °C y 50 °C, sin recuperación (sin regresarlas a 25 °C) el valor de la fluorescencia de la clorofila a (F_v/F_m) disminuyó poco aún en plantas expuestas a 50 °C respecto al grupo control (25 °C) y al tiempo cero, como se puede observar en la figura III.12a, mientras que la conductancia disminuyó en todas las temperaturas evaluadas en particular cuando las plantas se expusieron a 50 °C (figura III.12b).

Las plantas presentaron un aumento en la fuga de iones o fuga de electrolitos, como también es conocido, conforme aumentó la temperatura en relación a las mantenidas en la temperatura control de 25 °C (figura III.13a) mientras que el contenido relativo de agua disminuyó con forme aumentó la temperatura (figura III.13b).

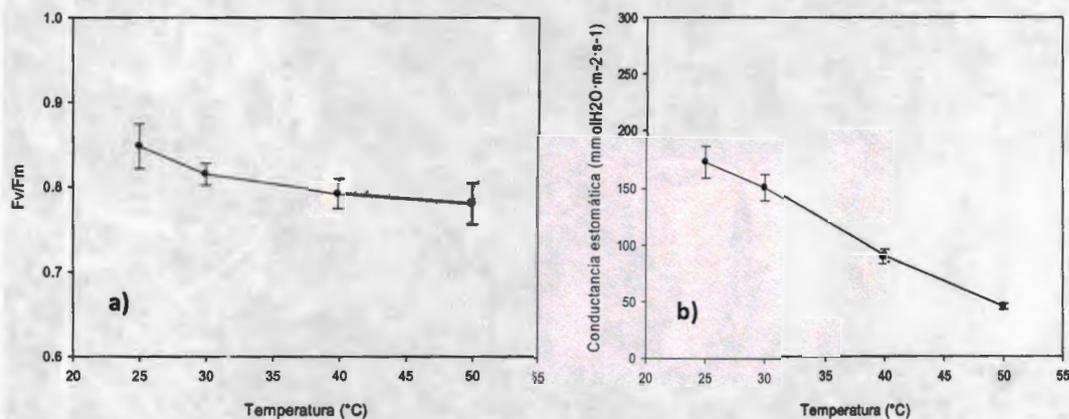


Figura III.12 Fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE.

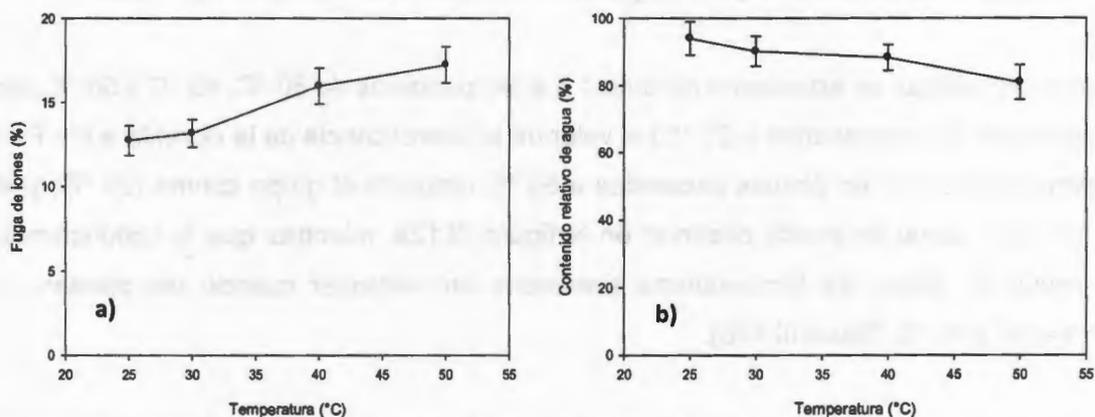


Figura III.13. Fuga de iones (%) y Contenido relativo de agua (%) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Tanto el porcentaje de Fuga de iones (a) como el porcentaje del Contenido relativo de agua (b) fueron medidos a partir de discos de hoja tomados con sacabocado N° 9 (1 cm diámetro) en el estrato medio de las plantas al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE.

Cuando las plantas se expusieron a 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h, en todos los tejidos evaluados (hoja, peciolo, tallo y raíz) disminuyó el contenido total de clorofila (clorofila a + clorofila b) así como en la clorofila a y clorofila b, observadas por separado, en relación a las plantas mantenidas a 25 °C (figura III.14). Aún cuando en hojas se midió la mayor cantidad de pigmentos, la disminución fue menor (figura III.14a) en relación con los tejidos restantes cuyas disminuciones fueron notables particularmente a 50 °C (figuras III.14b-d).

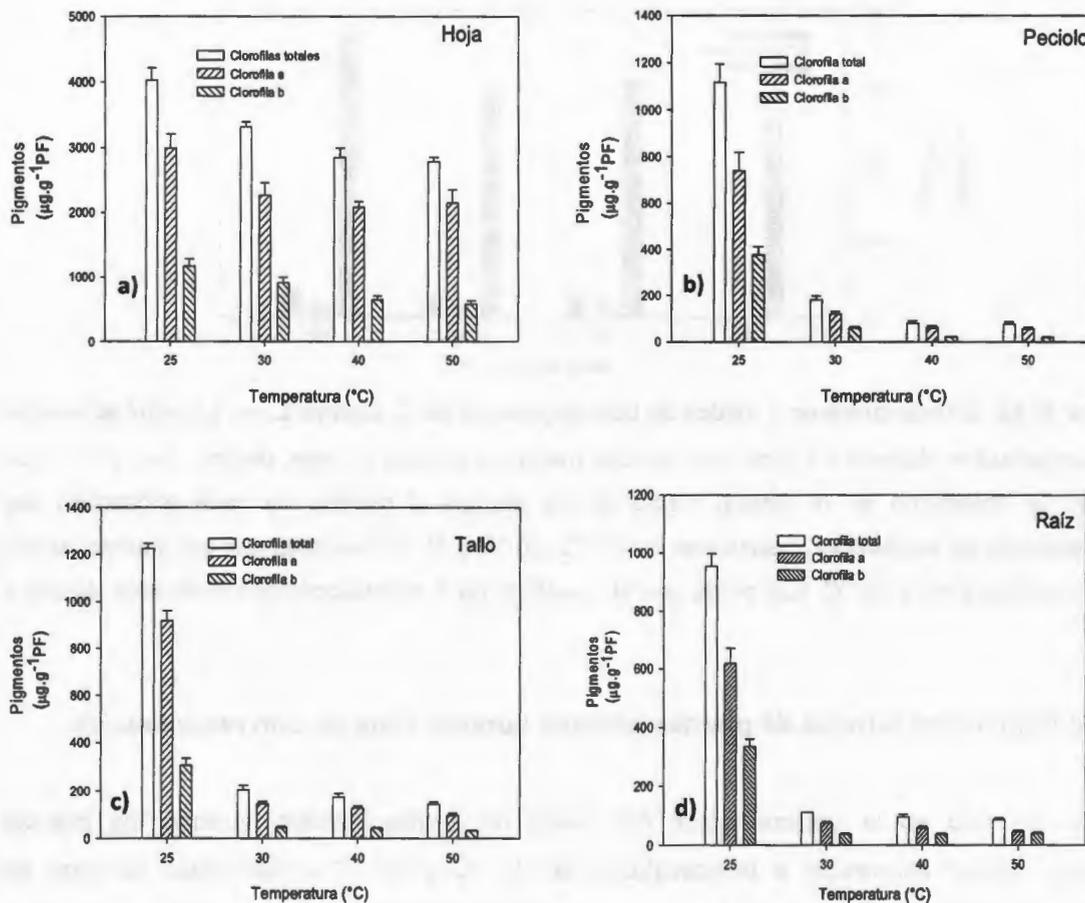


Figura III.14. Clorofilas en 4 tejidos de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Los pigmentos evaluados consistieron en clorofila total, clorofila a y clorofila b en hoja (a), peciolo (b), tallo (c) y raíz (d). Los tejidos se colectaron en el estrato medio de las plantas al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE.

Se notó un ligero aumento de carotenoides en hojas de plantas expuestas a las tres temperaturas en relación a las plantas mantenidas a 25 °C (control) sin embargo en las plantas control no se encontraron carotenoides en peciolo y tallo. Cuando las plantas fueron expuestas a 30 °C, 40 °C y 50 °C si se encontraron presentes en estos 2 tejidos. Interesantemente en raíz no se encontraron carotenoides ni en las plantas control ni en aquellas expuestas a las 3 diferentes temperaturas (figura III.15).

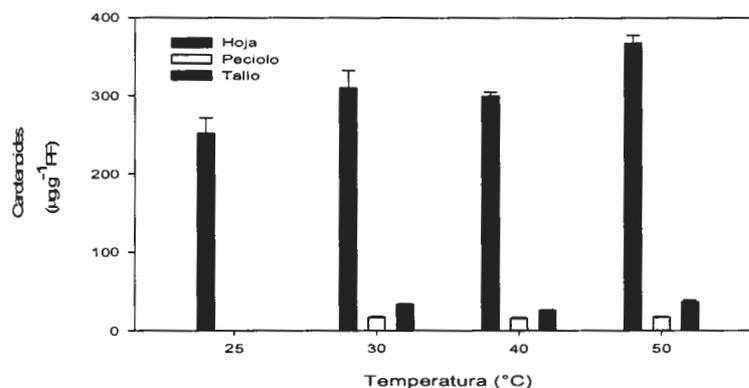


Figura III.15. Carotenoides en 4 tejidos de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas durante 1 h. Los carotenoides fueron evaluados en hoja, peciolo, tallo y raíz. Los tejidos se colectaron en el estrato medio de las plantas al término de cada exposición, las temperaturas de exposición consistieron en 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE.

III.3.4 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación

Como se notó en la determinación del punto de estrés térmico, cuando las plantas jóvenes fueron expuestas a temperaturas de 30 °C y 40 °C a diferentes tiempos de exposición, incluso a tiempo de 8 horas, presentaron valores de fluorescencia cercanos a 0.80. Sin embargo cuando la temperatura de exposición fue 50 °C durante 8 h las plantas jóvenes murieron en su totalidad. Es por ello que una temperatura de 50 °C y un tiempo de exposición de 4 h, resultaron adecuados para evaluar el estrés severo, las mediciones del punto estresante se realizaron 4 h después de haber concluido el experimento y regresar las plantas a 25 °C (recuperación) así como la medición del post estrés a 1 semana en recuperación.

El valor de F_v/F_m disminuyó en el punto estresante (4 h de recuperación) en relación al tiempo 0 y las plantas mantenidas a 25 °C. Después de 1 semana de recuperación el valor de fluorescencia aumento respecto a las 4 h de recuperación, pero sin llegar al obtenido en las plantas control (figura III.16a).

Los valores de conductancia disminuyeron tanto a las 4 h de recuperación como a 1 semana de recuperación en las plantas expuestas a 50 °C en comparación con aquellas mantenidas a 25 °C (figura III.16b)

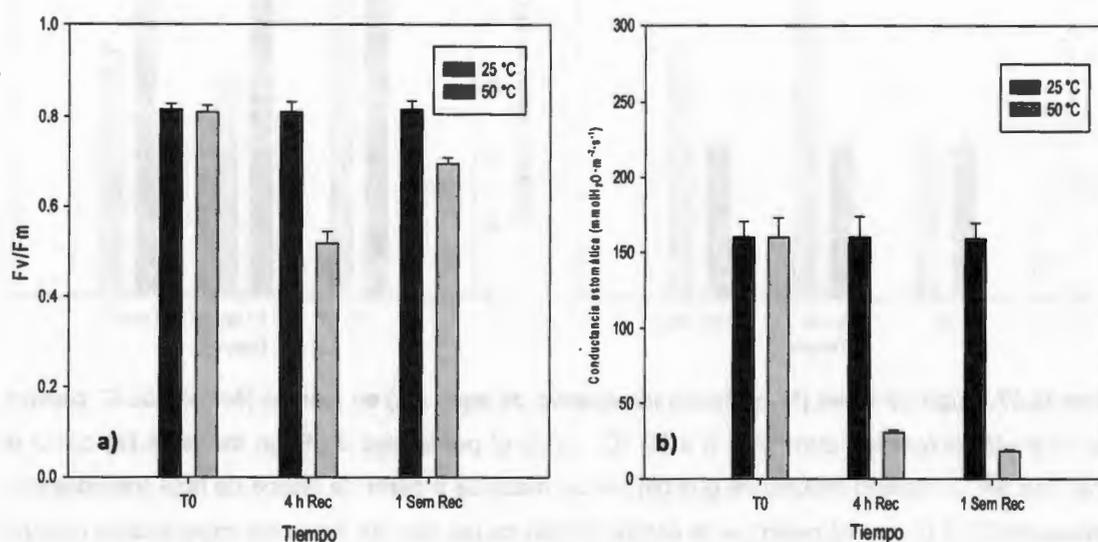


Figura III.16. Fluorescencia de la clorofila a (F_v/F_m) y conductancia estomática (g_s) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas durante 4 h a 50 °C. Tanto la fluorescencia de clorofila (a) como la conductancia (b) fueron medidas en hojas del estrato medio de las plantas jóvenes antes del experimento (tiempo cero), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación) y 1 semana de recuperación. Las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE.

En relación a la fuga de iones, se pudo observar que las plantas expuestas a 50 °C por 4 h sufrieron daño a nivel membrana y presentaron un aumento en el porcentaje de fuga de iones. Sin embargo este daño pareciera ser reversible ya que después de una semana de recuperación se observó una disminución en el porcentaje (figura III.17a).

De forma similar, la exposición de las plantas a 50 °C durante 4 horas causó deshidratación registrándose valores de contenido relativo de agua más bajos que al tiempo 0. Sin embargo las plantas fueron capaces de recuperar turgencia después de una semana de recuperación mostrando un incremento en los valores de contenido relativo de agua (figura III.17b).

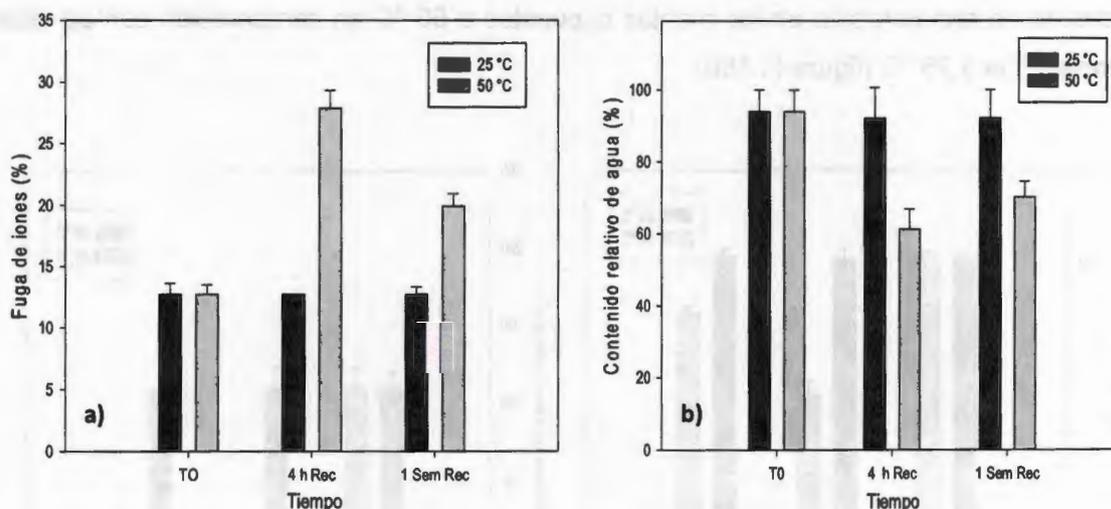


Figura III.17. Fuga de iones (%) y Contenido relativo de agua (%) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas durante 4 h a 50 °C. Tanto el porcentaje de Fuga de iones (a) como el porcentaje del Contenido relativo de agua (b) fueron medidos a partir de discos de hoja tomados con sacabocado N° 9 (1 cm diámetro) en el estrato medio de las plantas antes del experimento (tiempo cero), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación) y 1 semana de recuperación. Las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media \pm DE.

Cuando se evaluó el contenido de pigmentos se registró una disminución de la clorofila total (clorofila a + clorofila b), así como la clorofila a y clorofila b vistas por separado, en todos los tejidos evaluados. En hoja (figura III.18a) el contenido de carotenoides presentó un ligero aumento a las 4 h de recuperación en relación a las plantas control para luego disminuir a 1 semana de recuperación. Interessantemente en peciolo (figura III.18b) y tallo (figura III.18c) el registro de carotenoides solo ocurrió a las 4 h de recuperación mientras que en raíz no hubo presencia de éstos ni en las plantas control ni en las siguientes mediciones (figura III.18d).

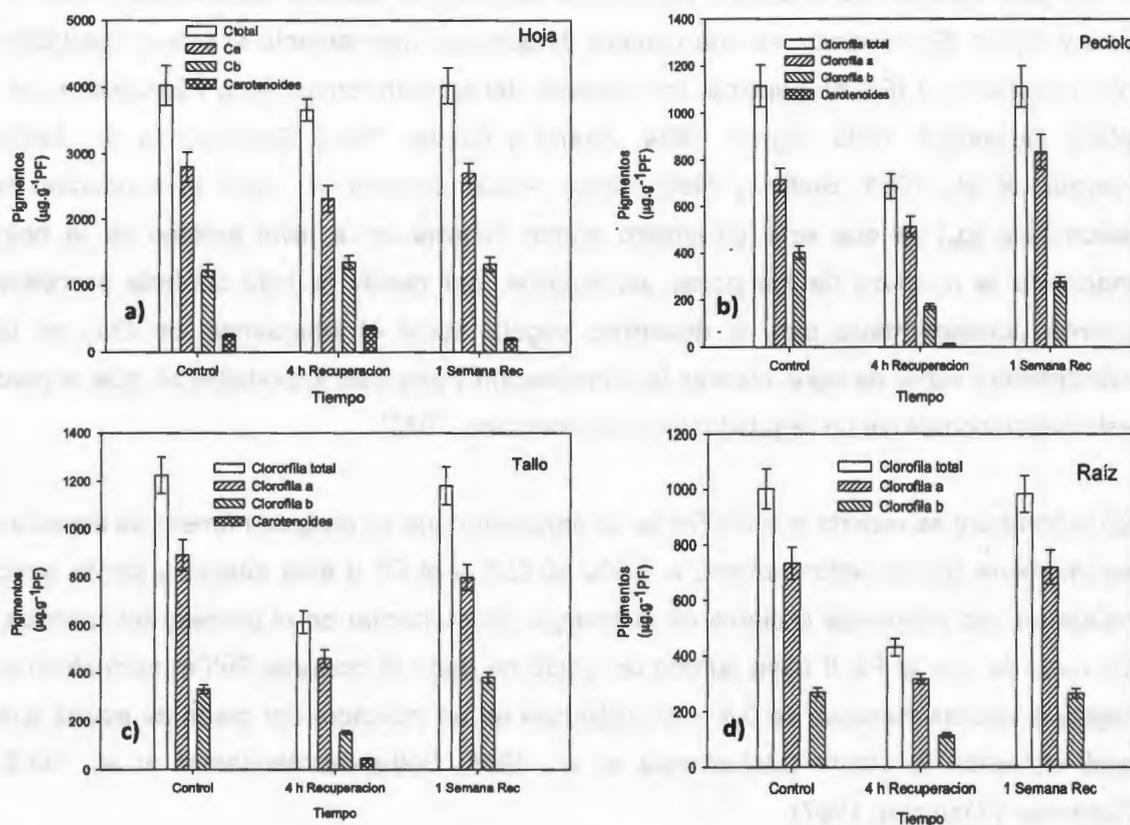


Figura III.18. Medición de pigmentos en 4 tejidos de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas durante 4 h a 50 °C. Los pigmentos evaluados consistieron en clorofila total, clorofila a, clorofila b y carotenoides, en hoja (a), peciolo (b), tallo (c) y raíz (d). Las colectas de tejido fueron en el estrato medio de las plantas antes del experimento (tiempo cero), 4 h después de regresar las plantas a 25 °C (recuperación) y 1 semana de recuperación. En el caso de la raíz, la colecta consistió en la parte central, con previa eliminación del sustrato. Las plantas control fueron mantenidas a 25 °C. Los datos son el resultado de 3 repeticiones con 5 réplicas. Media ± DE.

III.4 DISCUSIÓN

III.4.1 Determinación del punto de estrés térmico

Para la determinación del punto de estrés térmico, se midió la relación de fluorescencia variable entre la fluorescencia máxima o fluorescencia de la clorofila a (F_v/F_m) ya que varios autores consideran este parámetro fisiológico como una medida cuantitativa muy eficaz para caracterizar el estrés, además de ser muy sensible, no destructivo, *in situ*, *in vivo* y rápido. Su medición es una manera de conocer internamente el estado fisiológico del fotosistema II (FS II), principal componente del aparato fotosintético (González *et al.*, 2008; Govindjee, 1995; Ögren, 1994; Strand y Öquist, 1988; Schreiber *et al.*, 1988; Havaux *et al.*, 1988; Smille y Nott, 1982). Adicionalmente se midió la conductancia estomática (g_s) ya que este parámetro aporta información a nivel externo de la hoja indicando la apertura de los poros estomáticos, por donde la hoja controla procesos internos fundamentales para el desarrollo vegetal como el intercambio de CO_2 en la fotosíntesis y vapor de agua durante la transpiración y aún más importante es, que el poro estomático constituye un regulador térmico (Raschke, 1975).

En la literatura se reporta que F_v/F_m es un parámetro que en un gran número de especies se mantiene con un valor cercano a 0.800 ± 0.050 si el FS II está íntegro y por lo tanto refleja un uso altamente eficiente de la energía de excitación en el proceso fotoquímico. En caso de que el FS II haya sufrido un grado de daño el cociente F_v/F_m normalmente bajará a valores menores de 0.8, convirtiéndose en un indicador del grado de estrés que esté sufriendo la planta (Mohammed *et al.*, 1995; Bolhar-Nordenkamp *et al.*, 1989; Björkman y Demmig, 1987).

Dentro del proceso fotosintético la relación F_v/F_m se considera como una medida cuantitativa de la eficiencia fotoquímica máxima (o potencial) (Kitajima y Butler, 1975) o del rendimiento cuántico óptimo del FS II (Schreiber y Bilger, 1993) por lo tanto la disminución en F_v/F_m a altas temperaturas ha sido relacionada al declinamiento del funcionamiento de las reacciones fotoquímicas primarias, en particular por la inhibición del FS II, localizado en las membranas de los discos tilacoides (Berry y Bjorkman, 1980; Weis y Berry, 1988).

Sin embargo, cuando se evalúan tiempos relativamente cortos de exposición a altas temperaturas, puede existir una limitación en la interpretación de la información obtenida a través de F_v/F_m como la dificultad para distinguir entre daño por estrés severo, el cual es irreversible o por fotoinhibición temporal (reversible) como un mecanismo protector y adaptativo de la planta, ya que ambos pueden reflejarse en una disminución del valor de F_v/F_m fotoinhibición temporal (reversible) (Mohammed *et al*; 1995; Osmond, 1994). Por ello en esta tesis se evaluaron distintos tiempos de exposición a diferentes temperaturas y mediciones en distintos tiempos posteriores al estrés (recuperación) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol para determinar a qué tiempo de exposición y temperatura los daños son reversibles o irreversibles y así poder encontrar el punto de estrés térmico en dicha especie de estudio.

En esta tesis el valor de F_v/F_m en plantas jóvenes de 70 días de edad expuestas a cada temperatura (30 °C, 40 °C o 50 °C) durante 1 h, 2 h, 4 h y 8 h disminuyó conforme aumentaron, la temperatura y el tiempo de exposición. La disminución observada en F_v/F_m cuando las plantas fueron expuestas a 30 °C y 40 °C en los 4 tiempos de exposición y en las diferentes mediciones realizadas, tanto al término de la exposición como cuando las plantas fueron regresadas a 25 °C (recuperación), fue un valor ligeramente inferior a lo observado en las plantas control mantenidas a 25 °C (0.8480), sugiriendo poca afectación al aparato fotosintético aún a exposiciones de 8 h.

Esto coincide con Nakasone y Paull (1998) quienes reportaron en *Carica papaya* L. que la temperatura de 30 °C se considera óptima y Weng y Lai (2005) reportaron como temperatura crítica 43.85°C (± 0.51 °C), aunque en su trabajo no especificaron el cultivar; también Gil y Miranda (2008) reportaron como temperatura óptima de germinación de 30 °C con una humedad relativa de 80-90 % en *C. papaya* L. cv. Maradol roja y el híbrido Tainung-1, en este último caso vale la pena mencionar que la temperatura de germinación puede llegar a ser diferente a la temperatura capaz de causar daño en otros tejidos sobre todo por la cantidad de agua. Las semillas, dada la baja cantidad de agua, pueden tolerar por mayor tiempo mayores temperaturas que otros tejidos con alto contenido de agua como las hojas, sin embargo una temperatura de 30 °C en las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol, provocó sólo una ligera disminución en el valor de F_v/F_m sugiriendo poca afectación al FS II.

En las plantas jóvenes expuestas a 50 °C durante 1 h, la mayor afectación reflejada por la mayor disminución (8.01 %) en Fv/Fm fue a 1 h de recuperación, un valor de Fv/Fm de 0.7750 en relación a las plantas control (0.8480) que equivale a una disminución de 0.073 en la unidad relativa de Fv/Fm y se considera en términos fisiológicos como una condición poco dañina, de hecho en plantas de tomate Camejo, *et al.*, (2005) reportaron un valor cercano a 0.70, en las plantas control (sin exponerlas al estrés térmico) en su estudio.

Cuando se expuso a 50 °C durante 2 h, la mayor disminución (17.74 %) fue a las 2 h de recuperación, reflejando que el aumento de la afectación de Fv/Fm no fue al término de la exposición sino posterior, por ello en esta tesis se incluyeron mediciones posteriores a la exposición para estudiar la existencia de posibles daños después del choque térmico.

En las plantas expuestas a 50 °C durante 4 h y 8 h, las disminuciones en los valores de Fv/Fm fueron más evidentes; después de 4 h de exposición, la mayor disminución fue a las 24 h de recuperación (73.76 %) con un incremento después de 1 semana de recuperación, evidenciando la capacidad de las plantas de incrementar su eficiencia fotoquímica, esto no ocurrió cuando las plantas fueron expuestas por 8 h (100% muerte), ya que la disminución fue drástica (98.29 %) notándose desde el término de la exposición hasta a 8 h de recuperación, 24 h de recuperación y 1 semana de recuperación, reflejando un daño total al aparato fotosintético por estrés térmico.

El aumento en la exposición a varios tipos de estrés como el térmico, hídrico o lumínico, provocan una disminución en la proporción Fv/Fm, que se debe a la disminución de Fv ($F_v = F_m - F_0$) mientras F_0 aumenta, F_m se mantiene sin mucha variación (Yamada, 1996), bajo estas circunstancias las plantas presentan una incapacidad para usar de manera eficiente la luz tanto en bajas como altas temperaturas, cuando la afectación es reversible se nota un incremento de la respuesta fotoinhibitoria, es decir de una disminución de Fv/Fm, el valor vuelve a incrementarse una vez terminado el evento estresante. En la presente tesis se encontró una eficiente respuesta fotoinhibitoria en todas las temperaturas evaluadas tanto a 1 h, 2 h como 4 h mientras que a una exposición de 8 h solo las plantas expuestas a 50 °C fueron incapaces de mantener la respuesta fotoinhibitoria reflejado por la incapacidad de incrementar de nuevo su eficiencia fotoquímica (Fv/Fm) una vez concluida la exposición.

La disminución de F_v/F_m observada en esta tesis puede ser explicada de manera indirecta a través del conocimiento acerca del incremento de F_0 , ya que éste se encuentra relacionado con estrés por temperatura y ha sido reportado por varios autores (Goltsev *et al.*, 1994; Havaux, 1993; Bukhov *et al.*, 1990; Cao y Govindjee, 1990; Armond *et al.*, 1980). En plantas estresadas indica una disminución en la transferencia de energía hacia el centro de reacción, probablemente relacionado a la falta de asociación entre el complejo cosechador de luz y el centro de reacción, un mecanismo para liberar el exceso de energía en las plantas es en forma de calor (disipación).

También es sabido que el incremento en valores de F_0 indica modificaciones estructurales y funcionales del FS II probablemente relacionado con la capacidad de atrapar energía, debido a cambios en el complejo antena (Havaux, 1993; Armond *et al.*, 1980) cambios en los centros de reacción (Goltsev *et al.*, 1994; Bukhov *et al.*, 1990; Cao y Govindjee, 1990) así como a la separación irreversible del complejo antena con el centro de reacción del FS II. También se relaciona con la inactivación parcial pero reversible de FS II (Yamane *et al.*, 1997) y una reducción obscura de la plastoquinona QA, que es un transportador móvil de electrones en el proceso fotosintético (Havaux *et al.*, 1996)

Aún cuando la disminución de F_v/F_m y el incremento de los valores de F_0 indican una reducción en la capacidad de absorción de energía, estos no pueden reducir a cero el efecto por altas temperaturas sobre la cadena de transportes de electrones y la sobre reducción de sus intermediarios favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno como O_2 en cloroplastos, el cual solo podría ser controlado y disminuido por un sistema antioxidante eficiente.

Los resultados en esta tesis sugieren de manera indirecta que a una exposición de 50 °C durante 8 h se dañan por completo el sistema antioxidante mientras que las exposiciones durante 1 h, 2 h y 4 h aun a una temperatura de 50 °C, el sistema antioxidante es capaz de restablecer el estado fisiológico de las plantas evidenciado por las mediciones realizadas a 1 semana de recuperación con incremento en los valores de F_v/F_m .

La disminución en los valores de F_v/F_m por efecto de altas temperaturas ha sido reportado por Willits y Peet, (2001) en tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Trust) así como por Camejo, *et al.*, (2005) en *S. lycopersicum* cv. Amalia. También en estudios de la gramínea forrajera (*Festuca arundinacea*) por Cui, *et al.*, (2006) así como en pasto (*Agrostis palustris* Huds) por Liu y Huang (2000), los cuales servirán como base para discutir más adelante los dos experimentos de las plantas expuestas a 1 h (sin recuperación) y 4 h (recuperación).

En relación al estudio de la conductancia estomática en esta tesis, es sabido en la literatura que las principales funciones de los estomas es el intercambio de gases y la transpiración, en este último caso se considera como el mecanismo principal de regulación térmica de la hoja. Tales funciones dependen del mecanismo de apertura y cierre del poro estomático, el cual se controla por cambios en la turgencia de las células oclusivas y responde a diversos factores ambientales, como radiación solar (luz), humedad relativa, temperatura, disponibilidad de agua en el suelo, déficit de presión de vapor, concentración de CO_2 , y densidad de flujo fotónico en la fotosíntesis (Assmann y Gershenson, 1991).

Los factores ambientales pueden llegar a modificar las condiciones fisiológicas intrínsecas de la planta, en particular la luz (azul) ya que es el principal factor para el cierre o apertura de los estomas (Düring y Loveys, 1996). Smart y Robinson (1991) resumen el efecto de las condiciones ambientales en un día típico, el aumento que se produce a primeras horas de la mañana se debe a la luz, a medida que avanza el día, aumenta la temperatura, la planta transpira y cuando es incapaz de traslocar el agua suficiente desde las raíces para satisfacer las tasas de transpiración, cerrará parcial o totalmente los estomas. Avanzada la tarde, si las condiciones ambientales vuelven a ser propicias, la planta los abrirá de nuevo. Pero en cualquier caso, al atardecer como consecuencia de la caída de la luz, cerrarán y permanecerán así durante toda la noche.

La conductancia estomática (g_s) decrece rápidamente conforme el déficit hídrico aumenta, como un mecanismo para evitar la pérdida de agua; la disminución de la conductancia estomática está relacionada con la pérdida de turgencia pero también al aumento en la concentración de ácido abscísico (ABA). Independientemente de la fuente

de síntesis del ABA, si es derivado de raíz y transportado por xilema o sintetizado en el mesófilo de las hojas, éste se acumula en el apoplasto que rodea las células epidérmicas de la hoja, las células guardas reconocen el ABA y responden mediante el cierre estomático. La arquitectura de las células guardas y el cambio de pH en el apoplasto juegan un importante rol en el comportamiento del poro estomático (Liang *et al.*, 1997; Cowing *et al.*, 1993).

Una gran estrategia evolutiva común en plantas terrestres expuestas a altas temperaturas, como lo es el medio natural donde crece la especie tropical *C. papaya* L. cv. Maradol estudiada en esta tesis, es desarrollar una mayor tasa transpiratoria cuando el agua no es limitante (Damián *et al.*, 2009). En ausencia de limitaciones hídricas, la conductancia estomática está fuertemente correlacionada con el microclima luminoso y térmico de las hojas. El óptimo de temperatura para conductancia se suele situar entre 30 °C -32 °C y depende de la especie estudiada (Kriedemann y Smart, 1971).

En la presente tesis cuando las plantas fueron expuestas durante 1 h a las tres diferentes temperaturas evaluadas (30 °C, 40 °C o 50 °C), la conductancia disminuyó en relación a las plantas control, la mayor afectación fue en las plantas expuestas a 50 °C, justo al término de la exposición de 1 h, reflejado por la mayor disminución que fue de 74.63 %. En cambio cuando las plantas fueron expuestas a 2 h, las mayores disminuciones fueron justo al término de las 2 h de exposición tanto a 40 °C (75.24 %) y 50 °C (79.32%).

Interesantemente, cuando se aumentó el tiempo de exposición a 4 h, las plantas expuestas a las tres temperaturas presentaron los valores más bajos al término de la exposición, a 30 °C fue de 72.09 %, a 40 °C de 76.26 % y a 50 °C de 83.10 %.

Sin embargo, los valores empezaron a incrementar a partir de las 24 h de recuperación en todas las temperaturas sin igualar los valores iniciales, el menor incremento en la etapa de recuperación fue para las plantas expuestas a 50 °C, tanto a 1 h de exposición, a 2 h de exposición como a 4 h de exposición, aunque a las 4 h de exposición se registró el menor valor de recuperación. Reflejando que una exposición de 1 h o 2 h causa un cierre estomático de manera temporal aún a una temperatura de 50 °C, mientras que a 4 h de

exposición el cierre estomático es más prolongado, sugiriendo pérdida de turgencia debida a una mayor pérdida de agua. En cualquier caso se reflejó que las plantas fueron capaces de transpirar y de traslocar el agua suficiente desde las raíces para satisfacer las tasas de transpiración, ya que el cierre de los estomas fue temporal (Smart y Robinson, 1991).

A las 8 h de exposición la mayor disminución en la conductancia fue en las plantas expuestas a 50 °C, tanto al término de la exposición (96.77 %) como a 1 semana de recuperación con un valor de cero, es decir una disminución del 100 %, esta reducción total de la conductancia estomática observada en esta tesis implica el cierre total de los estomas y pérdida de agua, ya que al disminuir la turgencia celular, el poro se cierra, reflejando que las plantas son incapaces de transpirar y de traslocar el agua suficiente desde las raíces para satisfacer las tasas de transpiración (Smart y Robinson, 1991).

Las plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol se mantuvieron bajo luz y humedad constantes, así que la temperatura circundante en el interior de la cámara térmica, se consideró como la principal causa de la disminución del valor en la conductancia estomática, primero por ser la temperatura de referencia hacia la cual la hoja tiende y segundo por afectar directamente la turgencia de las células oclusivas, afectando a la hoja a nivel estomático y cloroplástico, por un lado el aumento de la temperatura afecta a la velocidad de las reacciones metabólicas (Q₁₀), por el otro si la temperatura del aire es elevada se puede producir un desequilibrio entre el estado hídrico de la hoja y el flujo de transpiración, de manera que si la demanda evapotranspirativa supera a la absorción por las raíces, los estomas se cierran y se frena el intercambio gaseoso (Carbonneau *et al*; 1992).

Además en el registro fotográfico también se observó el grave daño a las raíces cuando las plantas fueron expuestas a 50 °C durante 8 h, incluyendo ausencia de raíces secundarias reafirmando la posible incapacidad de las plantas para usar este tejido en la absorción y traslocación de agua desde la raíz.

La disminución en la conductancia estomática por incremento de temperatura también ha sido reportado en tiempos cortos de exposición sin recuperación (40 °C-45 °C durante 1 h y 2 h) por Yan, *et al.*, (2011) en sorgo, *Sorghum bicolor* L. en tiempos de exposición prolongados sin recuperación (30 °C por 20 días) como Cui, *et al.*, (2006) en la gramínea forrajera (*Festuca arundinacea*) y períodos medios de exposición con recuperación (35 °C, 40 ° y 45 °C por 5 h) como Luo, *et al.*, (2011) en uva (*Vitis amurensis* L).

Según Souza (*et al*, 2004) la disminución de la conductancia estomática al cerrarse los estomas puede ocasionar baja asimilación de CO₂ y crear un desbalance entre la actividad fotoquímica en el fotosistema II y el requerimiento de electrones conduciendo a una sobre excitación y daño a los centros de reacción del fotosistema II, esta relación entre la disminución entre la eficiencia fotoquímica del FS II (Fv/Fm) y la disminución entre la conductancia estomática se evidenció de manera muy clara en esta tesis cuando las plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol se expusieron a 50 °C durante 8 h, los niveles registrados disminuyeron un (98.29 %) en Fv/Fm y un 96.77 % en el caso de la conductancia, justo al término de las 8 h de exposición para luego disminuir hasta valores de cero en etapas de recuperación.

III.4.2 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación

Los resultados de Fv/Fm en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas durante 1 h indicaron una disminución en las 3 temperaturas evaluadas, la disminución fue del 3.89 % a 30 °C, 6.54 % a 40 °C y de 8.01 % a 50 C° y como se vió en el experimento anterior las plantas son capaces de recuperarse en mediciones posteriores, indicando poca afectación en la eficiencia fotoquímica del FS II, esto también fue reportado en un trabajo similar a esta tesis, donde Willits y Peet, (2001) realizaron un estudio en tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Trust (hoy reclasificado como *Solanum lycopersicum*) utilizando el valor de la fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) como un parámetro indicador de estrés por altas temperaturas en condiciones de laboratorio, se debe recalcar que dichos autores cortaron discos de hojas de las plantas, lo que supone un primer estrés al manipular la hoja y realizar el corte.

En esta tesis se evitó este paso, introduciendo la planta completa a la cámara térmica; los discos cortados se colocaron en placas con la temperatura controlada, sugiriendo que un parte del disco, el haz (superior) o el envés (inferior), estuvo en contacto con la placa mientras que el otro no. Las plantas tuvieron 3 meses de edad y el tiempo de exposición consistió en 30 min y 60 min a temperaturas de 15 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C.

Cuando el tiempo de exposición fue de 30 min, la curva para el valor de fluorescencia disminuyó de 0.84 (nivel máximo a 15 °C) hasta 0.79 (a 40 °C) una disminución del 5.95 % mientras que a un tiempo de exposición de 60 min la disminución fue de 0.84 (nivel máximo a 15 °C) hasta 0.76 (a 40 °C) representando una disminución del 9.52 %, en ambos casos el valor de F_v/F_m disminuyó ligeramente con el aumento de la temperatura de la parrilla. A los 60 min la curva declinó más rápidamente que la curva de 30 min, posiblemente debido a que un mayor tiempo de exposición a mayor temperatura incrementa el estrés térmico, algo que parece consistente con los resultados obtenidos en esta tesis, donde a pesar de que disminuyó el valor de F_v/F_m parece que la exposición de las plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol a las diferentes temperaturas durante 1 h no causó un daño severo, evidenciado por una ligera disminución en F_v/F_m .

Otro trabajo que incluyó la medición de F_v/F_m y otros parámetros fue el realizado por Cui, *et al.*, (2006), evaluaron en la gramínea forrajera *Festuca arundinacea* dos cultivares uno tolerante al calor (cv. Jaguar 3) y otro sensible (cv. TF 66) con una edad de 70 días de germinación, las plantas control se mantuvieron en las mismas condiciones de germinación de 20 °C/15 °C (día/noche) mientras que las plantas de ambos cultivares recibieron un choque térmico con una exposición de 30 °C/35 °C (día/noche) por 10 y 20 días. Similar a lo encontrado en esta tesis en papaya y a lo reportado por Willits y Peet, (2001) en tomate, hubo una disminución en los valores de F_v/F_m en ambos cultivares en comparación con las plantas mantenidas a temperatura control, en el caso del cultivar tolerante cv. Jaguar 3 la disminución fue del 2.43 % (10 días) y 4.87 % (20 días) mientras que el cultivar susceptible cv. TF 66 fue 7.40 % (10 días) y 16.04 % (20 días).

En relación a los otros parámetros medidos, se encontró una afectación de los estomas, reflejado por una disminución en la conductancia estomática en los dos cultivares tanto a los 10 días como a los 20 días de exposición, en el caso del cv. Jaguar 3 fue del 14.28 %

y 29.19 % respectivamente mientras que en cv. TF 66 fue del 42.85 % y 19.04 % respectivamente. Interesantemente igual disminuyó el valor de las clorofilas totales (clorofila a + clorofila b) en relación a las plantas control, que en cv. Jaguar 3 fue del 18.64 % y 33.89 % tanto a los 10 días y 20 días en el caso del cv. TF 66 fue 20 % y 30 % respectivamente. La disminución de la eficiencia fotoquímica del FS II así como la disminución de las clorofilas totales sugirió daño por el aumento del tiempo de la exposición en ambos cultivares y esto fue complementado por la medida de la fuga de iones, la cual aumentó evidenciado el daño membranal que en el caso del cv. Jaguar 3 fue un incremento del 57.89 % a los 10 días y 163.15 % a los 20 días mientras que en cv. TF 66 fue 110.52 % y 215.78 % respectivamente.

La disminución en la conductancia estomática por efecto de temperaturas elevadas también ha sido reportado por Yan, *et al.*, (2011) quienes evaluaron en sorgo (*Sorghum bicolor* L.), el efecto de la temperatura sobre plántulas de 30 días de germinación, las exposiciones consistieron en 40 °C por 1 h, 40 °C por 3 h, 45 °C por 1 h y 45 °C por 2 h, no se encontró diferencia significativa en las exposiciones de 40 °C y 45 °C durante 1 h respecto al control, mientras que a una exposición de 40 °C por 3 h se encontró una disminución del 35.72 % y a 45 °C por 2 h la disminución fue del 64.29 %.

Una de las causas de la disminución del valor de la conductancia estomática es la pérdida de agua ya que provoca disminuciones en la presión de turgencia en las células guarda del estoma, resultando en el cierre parcial o total del poro estomático. En esta tesis en las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol se pudo observar la disminución en los valores de la conductancia con una disminución del 12.96 % a una temperatura de 30 °C, un 48.55 % a 40 °C y 74.63 % a 50 °C, en relación a las plantas control, mientras se incrementó la pérdida de agua conforme aumentó la temperatura, esta pérdida se reflejó por la disminución en el contenido relativo de agua que disminuyó un 4.05 % a 30 °C, 6.03 % a 40 °C y un 13.78 % a 50 °C.

En esta tesis cuando se evaluaron los pigmentos, el contenido de las clorofilas totales, clorofila a y clorofila b, disminuyeron en los 4 tejidos evaluados: hoja, peciolo, tallo y raíz en las 3 temperaturas evaluadas. Interesantemente en raíz no se encontró carotenoides, éstos se encontraron en la temperatura control (25 °C) únicamente en hoja, los cuales

incrementaron conforme aumentó la temperatura, mientras que en peciolo, tallo y raíz la detección de los carotenoides fue a partir de 30 °C, con un ligero aumento a 40 °C y 50 °C. La fuga de iones aumentó conforme aumentó la temperatura de exposición en comparación a las plantas control (25 °C), el incremento fue de 3.44 % a 30 °C, 25.53 % a 40 °C y 35.34 % a 50 °C. En concordancia con Cui, *et al.*, (2006) en esta tesis se registró una disminución en los valores de Fv/Fm, de conductancia estomática, en el contenido de clorofilas mientras que se registró un aumento en los valores de fuga de iones y carotenoides.

También en el trabajo de Mo, *et al.*, (2011) se ha reportado el aumento del valor de la fuga de iones en plantas expuestas a altas temperaturas, utilizaron plántulas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con una edad de 35 días, la temperatura de exposición consistió en 33 °C durante 2 días, 4 días y 6 días. Las mediciones se realizaron al término de cada exposición y la temperatura control fue de 25 °C. Se encontró que la fuga de iones aumentó respecto al control, a los 2 días el incremento fue de 91.0 %, a los 4 días 120.9 % y a los 6 días fue 143.3 % mientras que el contenido relativo de agua disminuyó en un 11.7 %, 17.4 % y 18.9 % a los 2 días, 4 días y 6 días, respectivamente.

De igual forma a lo encontrado en la presente tesis, Xin, *et al.*, (2010) encontró un aumento en la fuga de iones en 2 cultivares de plantas de Lily, una especie con importancia en el mercado de flores. Uno de los cultivares usado fue tolerante al calor (*Lilium longiflorum* cv. *white heaven*) y el otro susceptible (*L. longiflorum* cv. *Acapulco*), las plantas de 30 días de edad se expusieron durante 1 h a 37 °C y 42 °C, la temperatura control fue de 22 °C. En el cultivar tolerante la fuga de iones incrementó 10 % tanto a 37 °C y 42 °C en relación a las plantas control, mientras que en las mismas temperaturas evaluadas en el cultivar susceptible, la fuga de iones se incrementó un 50 % y 75 % en relación a las plantas control.

III.4.3 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación

Un trabajo similar que incluyó el estudio del efecto de las altas temperaturas en plantas tropicales tanto en el estrés como post estrés (recuperación) fue el de Camejo, *et al.*, (2005) en tomate, por cierto un fruto originario del centro y sur de América y que hoy es

ampliamente cultivado en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, una situación bastante similar para *C. papaya* L. cv. Maradol. Este trabajo sirvió como base en gran medida para el diseño de los experimentos en esta tesis, por ello a continuación se discute a detalle. Camejo, *et al.*, (2005) expusieron plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Amalia) a una temperatura de 45 °C con 2 diferentes tiempos de duración que consistieron en 2 h y 3 h, al término de la exposición fueron regresadas a condiciones iniciales (recuperación) a una temperatura de 25 °C. En las plantas control mantenidas a 25 °C el valor de Fv/Fm fue 0.70, mientras que al término de las 2 h de exposición fue de 0.50 (una reducción del 28.57 %) y al término de las 3 h de exposición fue de 0.30 (disminución del 57.14 %).

Cuando se evaluó el período post estrés en las plantas de tomate a las 2 h de recuperación el valor fue de 0.60 una disminución del 14.28 % respecto a las plantas control y a las 3 h fue de 0.55, una disminución del 21.42 %, los autores concluyeron que entre 2 h y 3 h de exposición si se encontraron diferencias significativas respecto a las plantas control mientras que a 2 h y 3 h de recuperación éstas no fueron significativas y que la disminución en la eficiencia fotoquímica del FS II (Fv/Fm) en las plantas de tomate expuestas a 45 °C en los 2 tiempos evaluados indicó un aumento fotoinhibitorio (menor valor de Fv/Fm) pero reversible, reflejado por el aumento en la respuesta fotoinhibitoria al aumentar el valor de Fv/Fm una vez terminado el evento estresante (recuperación).

Camejo, *et al.*, (2005) también incluyeron la evaluación del contenido de clorofilas y no encontraron diferencias significativas ni en la etapa del estrés ni en la etapa del post estrés en relación a las plantas control. Aunque los valores los reportaron en mg/mL, mientras que en esta tesis se reportan como $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ en estas últimas unidades el valor suele ser algo mayor al incluir el factor de dilución.

La tasa de deshidratación fue despreciable, sugiriendo poca afectación en el contenido relativo de agua, así que al menos en tomate bajo estas condiciones, los autores concluyeron que la disminución de Fv/Fm no está relacionado con la pérdida de clorofila ni deshidratación pero interesantemente si lo relacionaron con la pérdida de estabilidad de la isoenzima antioxidante CuZnSOD (superóxido dismutasa) al aumentar la temperatura, cuya actividad a 25 °C representó un 70 % de la actividad total del extracto mientras que a

45 °C, con una exposición de 2 h y 3 h fue 57 % y 30 %, respectivamente, indicando una alta susceptibilidad, no se debe olvidar que el estrés oxidativo causa irregularidades en la cadena de transporte de electrones. También en guisante (Havaux, 1993), se ha reportado la reducción de la actividad de CuZnSOD con el incremento de temperatura tanto en citoplasma como en cloroplasto, sugiriendo con ello, que la falla en el sistema antioxidante puede ser un factor para la disminución de la eficiencia fotoquímica del FS II (menor valor de Fv/Fm).

Como dato adicional los autores evaluaron un tiempo de 20 h de recuperación, midiendo únicamente Fv/Fm, el valor ascendió sin alcanzar a los valores observados en las plantas control. Los autores atribuyeron esta recuperación parcial de Fv/Fm a una afectación breve pero reversible del FS II presumiblemente en el complejo cosechador de luz provocada por el aumento de temperatura, sugiriendo que los eventos fotoquímicos limitaron la completa recuperación de la eficiencia fotoquímica del FS II, probablemente relacionado también a la recuperación de la proteína D1, la cual se sabe es fosforilada y degradada bajo condiciones de estrés por altas temperaturas (Asada *et al.*, 1998).

Se ha reportado una cinética bifásica en la recuperación de la eficiencia del FS II después de la fotoinhibición (Hurry y Huner, 1992; Krause y Weis, 1991) una fase rápida y otra lenta, en la fase lenta de recuperación el centro de reacción del fotosistema II fotoinhibido es reparado al sustituir la proteína D1 dañada con copias sintetizadas nuevamente (Prasil, *et al.*, 1992) mientras que en la fase rápida no se logra la sustitución total debido posiblemente a una tasa baja de degradación de las proteínas D1 dañadas irreversiblemente (Aro *et al.*, 1993).

En esta tesis, de forma similar a Camejo, *et al.*, (2005) se encontró una disminución en los valores de Fv/Fm, la disminución respecto al control fue del 38.4 % en el punto de estrés térmico (4 h de recuperación) y a 1 semana de recuperación la disminución fue de 18.05 % (recuperación parcial). A diferencia de lo encontrado por Camejo, *et al.*, (2005), en las plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol hubo una afectación más evidente, se observó una disminución en el contenido de clorofilas totales (clorofila a + clorofila b) en los 4 tejidos respecto a las plantas control, en hoja la disminución fue del 8.99 %, en peciolo 38.47 %, en tallo 49.94 % y en raíz fue 57.11 % mientras que en la etapa de

recuperación las clorofilas totales alcanzaron los mismos niveles que las plantas control en todos los tejidos. En relación a los carotenoides, en hoja se encontraron presentes en las distintas mediciones, en comparación con las plantas control hubo un incremento del 44.87 % a las 4 h de recuperación y del 21.85 % a 1 semana de recuperación. En peciolo y tallo sólo se detectaron a las 4 h de recuperación interesantemente en raíz no se encontró carotenoides en ninguna de las mediciones mientras que el contenido relativo de agua disminuyó más de una cuarta parte en relación a las plantas control, es decir un 34.76 % a 4 h de recuperación y un 25.32 % a 1 semana de recuperación, en relación a tomate parece que papaya es más susceptible a la pérdida de agua.

Dado que en condiciones de estrés se producen formas reactivas del O₂ que pueden causar daños a nivel celular, las plantas las reducen o eliminan con carotenoides y enzimas, pero en caso extremo, la proteína D1 del sistema pigmentario II debe aceptar dichos productos a costa de su propia destrucción con resultante fotoinhibición. Aunque en condiciones normales los carotenoides desempeñan un papel importante en el complejo colector de luz, el aumento de carotenoides en *C. papaya* L. cv. Maradol podría deberse a su rol en la fotoprotección de los fotosistemas, varios estudios han mostrado que estos compuestos son importantes en proteger el aparato fotosintético contra el fotodaño, por inter conversiones entre las moléculas de xantofila (Ort, 2001; Young *et al.*, 1997). En el ciclo de la xantofila, violaxantina a través de una de-epoxidación se convierte a anteraxantina y finalmente zeaxantina (Havaux, 1988). La zeaxantina participa en la regulación de la disipación de energía en forma de calor del FS II, cuando este tiene una sobrecarga energética (Ort, 2001; Ramalho *et al.*, 2000).

Otro trabajo sobre el efecto de temperaturas altas en diversos parámetros fisiológicos por un tiempo prolongado aunque sin la evaluación de la etapa post estrés, consistió en la exposición de dos cultivares de pasto (*Agrostis palustris* Huds) uno tolerante al calor (L-93) y otro sensible (Penncross) realizado por Liu y Huang (2000), estos autores midieron Fv/Fm, contenido de clorofilas y fuga de iones. El pasto fue colectado de una parcela, con una edad de establecimiento de dos años y mantenido durante 2 meses en una cámara de aclimatación con un régimen de 22 °C/16 °C día/noche, después la mitad permaneció en la cámara de aclimatación mientras que la mitad restante se transfirió a otra cámara con un régimen de 35 °C/25 °C día/noche, aunque en este caso se debe resaltar que la

temperatura se incrementó entre 4 °C y 5 °C cada día durante 3 días, es decir el incremento no fue inmediato, sino gradual y así permaneció hasta 56 días. Una vez alcanzada la temperatura del experimento, las mediciones se realizaron a los 14 días, 28 días, 46 días y 52 días.

Similar a lo encontrado en esta tesis, Liu y Huang (2000), reportaron una disminución en Fv/Fm así como en el contenido de clorofilas totales en ambos cultivares. La mayor afectación fue a los 56 días para los tres parámetros medidos, el valor de Fv/Fm fue más bajo que las plantas control en un 34 % en el cultivar L-93 y 36 % en Penncross mientras que el contenido de clorofila fue menor en un 51 % en el cultivar L-93 y 72 % en Penncross en relación a las plantas control, en ambos cultivares se incrementó la fuga de iones del 200 % en L-93 y cerca del 300 % en Penncross, en esta tesis también se registró un aumento en la fuga de iones en las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol, el incremento fue del 118.92 % a las 4 h de recuperación y de un 56.51 % a 1 semana de recuperación, sugiriendo daño a la membrana en particular a las 4 h de recuperación.

Es sabido que bajo estrés abiótico, aumenta la producción de radicales libres y esto a su vez, es responsable de la peroxidación de los lípidos de la membrana por medio de la oxidación de los ácidos grasos insaturados que conllevan a permeabilidad de la membrana e incrementando la fuga de iones.

La disminución en las clorofilas totales por temperaturas elevadas también ha sido reportado por Almeselmani, *et al.*, (2012) para ello compararon dos genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) uno tolerante (C306) y otro susceptible (PBW343), ambos se germinaron durante 45 días, en 2 cámaras con el ambiente controlado (23 °C/18 °C día/noche). A partir del día 46 un grupo (tanto plantas C306 como PBW343) permaneció en las mismas condiciones durante todo el experimento (grupo control) mientras que en la cámara donde se encontró el grupo experimental (plantas C306 y PBW343) se aumentó la temperatura de manera gradual de 23 °C/18 °C día/noche a 35 °C/25 °C día/noche, el incremento se realizó al día 46 y fue de 1 °C por cada 1 h, hasta alcanzar los 35 °C, es decir no consistió en un choque térmico como se realizó en esta tesis con las plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol, una vez alcanzada la temperatura de 35 °C, la condición de 35 °C/25 °C, permaneció hasta el final del experimento.

Después de haber alcanzado la temperatura de estrés, las mediciones se realizaron a 1 semana (estado vegetativo), 30 días (antesis) y 45 días (post antesis) tanto en el grupo control como en el experimental, se encontró que el contenido total de clorofilas se redujo en los tres estados de desarrollo, en los dos genotipos, aunque la reducción fue mayor en el genotipo susceptible PBW343 un 29.2 % y 60.9 % respecto al control, también presentó la mayor disminución en fotosíntesis e incremento de la respiración. La menor reducción en el contenido total de clorofilas fue en el genotipo tolerante C306 con 22.8 % (antesis) y 47.5 % (post antesis) la mejor tolerancia estuvo acompañada de menor disminución en fotosíntesis y mantenimiento de la respiración. Interesantemente C306 también mantuvo su nivel de expresión (constitutiva) del gen *hsp 101*, reportado como crucial para la termotolerancia tanto basal como adquirida.

La diferencia significativa en el contenido de clorofilas entre C306 y PBW343, según los autores sugiere una susceptibilidad diferente en la formación/descomposición de clorofila en el estrés térmico, de hecho la reducción en el contenido de clorofila debido a estrés térmico también ha sido reportado en otros estudios por Almeselmani, *et al.*, (2009) y por Almeselmani, *et al.*, (2006). En pepino y trigo Tewari y Tripathy (1998) se sabe que el estrés por calor reduce el contenido de clorofila al inhibirse la biosíntesis de la clorofila a 42 °C debido a la inactividad de la enzima de porfobilinógeno deaminasa y por lo tanto la disminución del contenido de protoclorofilide.

Según Harding, *et al.*, 1990 la pérdida de clorofila así como el desajuste de los componentes tilacoidales por estrés a altas temperaturas provocan senescencia foliar. Otra afectación en plantas de *Annona herimola* expuestas a calor fue la disminución en la fotosíntesis asociado a la disminución del contenido de clorofila y tanto por limitaciones estomáticas como por limitaciones no estomáticas (Higuchia *et al.*, 1999).

Uno de los pocos trabajos sobre conductancia estomática tanto en el estrés por temperaturas como en la etapa de recuperación es el de Luo, *et al.*, (2011) quienes sometieron plantas de uva (*Vitis amurensis* L) con una 1 año de edad, a diferentes temperaturas. Las plantas se mantuvieron a una temperatura control de 25 °C/18 °C día/noche mientras que las plantas sometidas a estrés se sometieron a tres temperaturas diferentes 35 °C, 40 ° y 45 °C por 5 h, al término de la exposición fueron regresadas a

condiciones iniciales de 25 °C, la medición en recuperación fue a las 20 h. Ellos encontraron que a 35 °C, no hubo diferencia significativa al término de la exposición ni a las 20 h de recuperación. Sin embargo comparados con las plantas control, las plantas expuestas a 40 °C y 45 °C, presentaron disminución en un 56.25 % y 81.25 % respectivamente al término de la exposición mientras que en la etapa de recuperación la disminución respecto al control fue de 37.5 % y 62.5 %, a las temperaturas de 40 °C y 45 °C, respectivamente.

También se encontró una disminución en la conductancia estomática por efecto del incremento de la temperatura, que fue del 80.78 % a las 4 h de recuperación y aún mayor cuando se midió a 1 semana de recuperación que fue de un 88.5 %, sugiriendo poca apertura estomática para evitar la pérdida de agua, esta pérdida de agua se evidenció con la disminución en el contenido relativo de agua, que como se mencionó antes fue mayor a 4 h de recuperación (34.76 %) que a 1 semana de recuperación (25.32 %).

III.5 CONCLUSIONES

En la presente tesis, en la determinación del punto de estrés térmico, se documentó que las afectaciones más evidentes tanto en la fluorescencia de la clorofila a como en la conductancia estomática en plantas jóvenes de *Carica papaya* cv Maradol se dieron en aquellas expuestas a 50 °C, en particular cuando el tiempo de exposición fue 4 h y 8 h respectivamente.

Se concluye que las plantas con una edad de 70 días expuestas a 30 °C, 40 °C o 50 °C durante 1 h, 2 h y 4 h de exposición, pueden recuperar su eficiencia fotoquímica una vez terminado el choque térmico, evidenciado por un incremento en los valores de Fv/Fm así como un incremento en los niveles de conductancia incluso a una temperatura de 50 °C, reflejando una fotoinhibición temporal. Sin embargo una exposición de 50 °C durante 8 h causó un daño irreversible debido al estrés por altas temperaturas, evidenciado por valores cercanos a cero en ambos parámetros evaluados, aunque vale la pena remarcar que la conductancia estomática resultó ser un parámetro más sensible en todas las exposiciones.

El punto de estrés térmico se determinó a las 4 h de recuperación (25 °C) después de que las plantas fueron sometidas previamente a 50 °C durante 4 h, ya que después de este momento se presentó abscisión de hojas y dificultó las diversas mediciones en hojas. Hasta la fecha no hay una clasificación del estrés moderado, severo o crítico en base a mediciones de la fluorescencia de la clorofila a (Fv/Fm) en *C. papaya* L. cv. Maradol.

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis se propone que una disminución de hasta 30 % se considere como estrés moderado, de 31 % a 60 % como estrés severo ambos caracterizados por la reversibilidad del daño al aumentar la respuesta fotoinhibitoria (capacidad de incrementar de nuevo el valor de Fv/Fm) así como estrés crítico cuando la disminución alcance un 61 % a 100 %, caracterizado en gran medida por la irreversibilidad del daño al ser escasa o nula la respuesta fotoinhibitoria.

La razón por la cual se eligió 4 h de recuperación una vez concluida la exposición de 50 °C durante 4 h como punto de estrés térmico es porque la afectación de Fv/Fm fue de un 38.4 % y no hubo pérdidas de hojas, ya que ésta se dio a las 24 h de recuperación cuya afectación en la fluorescencia fue 73.80 %, además las plantas pudieron recuperarse. Las temperaturas de 30 °C y 40 °C, aún a 4 h y 8 h sólo producen estrés moderado, mientras que una exposición a 50 °C durante 8 h se generó estrés crítico y finalmente la muerte (marchitez permanente).

En los 2 experimentos siguientes de exposición a diferentes temperaturas con una duración de 1 h y 4 h el estrés por altas temperaturas originó en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol una disminución en la eficiencia fotoquímica del FS II y conductancia estomática esto también coincidió con una disminución en el contenido de clorofilas, una disminución en el contenido relativo de agua, pero acompañado de un aumento en el contenido de carotenoides y aumento en la fuga de iones, particularmente en el experimento de 4 h por ser un mayor tiempo de exposición.

El resultado en esta tesis así como los estudios realizados por otros autores, de los cuales varios ya fueron discutidos, indican que el daño por estrés térmico (altas temperaturas) depende de la temperatura y el tiempo a los cuales son expuestas las plantas, este daño afecta principalmente la integridad del aparato fotosintético y membranas celulares,

afectando el crecimiento de las plantas, tanto en hojas, peciolo, tallos y raíces. Al menos en hojas fue evidente la clorosis y abscisión de hojas. Las mayores afectaciones se registraron en el punto de estrés térmico (4 h de recuperación), en relación a las plantas en la condición post estrés (1 semana de recuperación) y a las plantas en la condición de estrés moderado (exposición de 1 h).

III.6 REFERENCIAS

- Almeselmani, M., P. S., Deshmukh y V. Chinnusamy (2012). Effects of prolonged high temperature stress on respiration, photosynthesis and gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties differing in their thermotolerance. *Plant Stress*, 6, 25–32.
- Almeselmani, M., P. S. Deshmukh y R. K. Sairam (2009). High temperature stress Tolerance in wheat genotypes: Role of antioxidant defense enzymes. *Acta Agronómica Hungarica*, 57, 1-14.
- Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., S. R. Kushwaha y T. P. Singh (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science*, 171, 382-388.
- Armond, P. A., Björkman, O. y L. A. Staehelin (1980). Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 601, 433-442.
- Arnon, D. L (1949). A copper enzyme is isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- Aro, E. M., S. McCaffery y J. M. Anderson (1993). Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiol.* November; 103,3, 835–843.
- Asada, K., Endo, T., J. Mano y C. Miyake (1998). Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress. *In* K. Saton and N. Murata (eds.), *Stress Responses of Photosynthetic Organisms*. Elsevier, Amsterdam, pp. 37-52.
- Assmann, S. M. y A. Gershehson (1991). The cinetics of stomatal responses to VPD in *Vicia faba*: electrophysiological and water relations models. *Plant Cell* 14:455-465.
- 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.
- Berry, J. y O. Bjorkman (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31, 491–543.

- Betts, R. A. (1997). Contrasting Physiological and structural vegetation feedbacks in climate change simulations. *Nature*, 387, 796-799.
- Björkman, O. y B. Demmig (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489–504.
- Blum, A. y A. Ebercon (1981). Cellmembrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.*, 21, 43–47.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Oquist, G., U. Schreiber y E.G. Lechner (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol*, 3, 497–514.
- Bowler, C., M. Van Montagu y D. Inze (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43:83–116.
- Bukhov, N. G., Sabat, S. y P. Mohanty (1990). Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplast. *Photosynth Res*, 23, 81-87.
- Burke, J. J. y M. J. Oliver (1992) Differential temperature sensitivity of pea superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, 100, 1595-1598.
- Camejo, D., Rodríguez, P., Angeles, M., Dell'Amico, J. M., A. Torrecillas y J. J. Alarcón (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.*, 162, 281-289.
- Cao, J. y B. Govindjee (1990). Chlorophyll a fluorescence transients an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1015, 180-188.
- Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 38, 432–447.
- Cowing, D. J. G., H. G. Jones y W. J. Davies (1993). Xylem transported abscisic acid: The relative importance of its mass and its concentration in the control of stomatal aperture. *Plant Cell Environ.*, 16, 453-459.
- Cross, R. H., McKay, SAB, A. G. McHughen y P. C. Bonham-Smith (2003). Heat-stress effects on reproduction and seed set in *Linum usitatissimum* L. (flax). *Plant, Cell and Environment*, 26, 1013–1020.
- Damián, A., Ramírez, I., Peña, C. B., Díaz, G. y V. A. González (2009). Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 119-126, 2009.

- Dhindsa, R.S., y W. Matowe (1981). Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 32:79–91.
- Dhindsa, R.S., P.P. Dhindsa y T.A. Thorpe (1981). Leaf senescence: correlated with increased level of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32:93–101.
- Gil, A. I. y D. Miranda (2008). Efecto de la temperatura, inmersión en agua y concentración de fitorreguladores sobre la germinación de semillas de papaya (*Carica papaya* L.) *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2(1), 9-20.
- Goltsev, V., Yordanov, I. y T. Tsonev (1994). Evaluation of relative contribution of initial and variable chlorophyll fluorescence measured at different temperatures. *Photosynthetica*, 30, 629-643.
- Gomos, Z., Wada, H., E. Hideg y N. Murata (1994). The unsaturation of membrane lipids stabilizes photosynthesis against heat stress plant physiology. *Plant Physiology*, 104, 563–567.
- González, S., H. Perales y M. Salcedo (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Govindjee, (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol*, 22, 131–160.
- Harding, S. A., Guikema, J. A., and Paulsen, G. M. 1990. Photosynthetic decline from high temperature during maturation of wheat I: Interaction with senescence process. *Plant Physiol*. 92: 648–653.
- Havaux, M (1996). Short term responses of Photosystem I to heat stress. Induction of a PSII-independent electron transport trough PSI fed by stromal components. *Photosynth. Res*, 1996, 47, 85-97.
- Havaux, M (1993). Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Science*, 94, 19-33.
- Havaux, M., M. Ernez y R. Lannoye (1988). Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. *J. Plant Physiol*, 133, 555–560.
- Hendry, G.A.F. y A.H. Price (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (Eds.), *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman & Hall, London, pp. 148–152.
- Hewezi, T., M. Léger y L. Gentzbittel (2008). A Comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Gene Expression in Sunflower. *Annals of Botany*, 102, 127–140.

- Higuchia, H., T. Sakuratania y N. Utsunomiya (1999). Photosynthesis, leaf morphology, and shoot growth as affected by temperatures in cherimoya (*Annona herimola* Mill.) trees. *Sci. Hortic.*, 80: 91-104.
- Hurry, V. M. y N. P. Huner (1992). Effect of cold hardening on sensitivity of winter and spring wheat leaves to short-term photoinhibition and recovery of photosynthesis. *Plant Physiol.*, 100, 1283-1290.
- Kim, K. y A.R. Portis Jr (2005). Temperature dependence of photosynthesis in Arabidopsis plants with modifications in Rubisco activase and membrane fluidity, *Plant Cell Physiol*, 46, 522–530.
- Kitajima, M. y W.L. Butler (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochem. Et Biophys. Acta* 376, 105–115.
- Krause, G. H. y E. Weis (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 42, 313-349.
- Kriedemann, P. E. y R. E. Smart (1971). "Effects of irradiance, temperature and leaf water potential on photosynthesis of vine leaves." *Photosynthetica* 5,1, 6-15.
- Cui, L., Li, J., Fan, Y., Xu, S. y Z. Zhang (2006). High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Botanical Studies* 47: 61-69.
- Larcher, W (1995). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 340–353.
- Levitt, J (1980). *Responses of plants to environmental stress*. 2nd Edition. Academic Press, New York.
- Liang, J., J. Zhang y M. H. Wong (1997). How do roots control xylem sap ABA concentration in response to soil drying? *Plant Cell Physiol.*, 38, 10-16.
- Liu, X. y B. Huang (2000) Heat Stress Injury in Relation to Membrane Lipid Peroxidation in Creeping Bentgrass. *Crop Sci.*, 40, 503–510.
- Loik, M. E., S. P. Redar y J. Harte (2000). Photosynthetic responses to a climate-warming manipulation for contrasting meadow species in the Rocky Mountains, Colorado, USA. *Funct. Ecol.*, 14, 166-175.
- Lu S, Guo Z, Peng X (2003). Effects of ABA and S-3307 on drought resistance and antioxidative enzyme activity of turfgrass. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78, 663- 666.
- Luo H-B, Ma L, Xi H-F, Duan W, Li S-H, et al. (2011) Photosynthetic Responses to Heat Treatments at Different Temperatures and following Recovery in Grapevine (*Vitis amurensis* L.) Leaves. *PLoS ONE* 6(8): e23033.

- Marcum, K.B. (1998). Cell membrane thermostability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass *Crop Sci.*, 38, 1214-1218.
- Maxwell, K y G.N. Johnson (2000). Chlorophyll fluorescence, a practical guide. *Journal Experimental Botany*, 51, 345, 659-668.
- Mo, Y., Liang, G., W. Shi y J. Xie (2011). Metabolic responses of alfalfa (*Medicago Sativa* L.) leaves to low and high temperature induced stresses. *African Journal of Biotechnology*, 10,7, 1117-1124.
- Mohammed, G.D., W.D. Binder y L. Gillies (1995). Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. For. Res.*, 10, 383–410.
- Bajji, M., Kinet, J. M. y S. Lutts (2001). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 00, 1–10.
- Nakasone, H. Y. y R. E. Paull (1998). Tropical fruits. *Crop production science in horticulture*. Vol. 7. Cab International Publication.
- Ögren, E (1994). The significance of photoinhibition for photosynthetic productivity. In: Baker, N.R., Bowyer, J.R. (ed), *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Scientific Publisher, Oxford, pp. 433–447.
- Ort, D (2001). When there is too much light. *Plant Physiol*, 125, 29–32.
- Osmond, C.B (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants, in: N.R. Baker and J.R. Bowyer (eds.). *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom. pp. 1–24.
- Peet, M. M., S. Sato y R. G. Gardner (1998). Comparing heat stress effects on male-fertile and male sterile tomatoes. *Plant Cell Environ.*, 21, 225-231.
- Porch, T. G y M. Jahin (2001). Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* 24, 723-731.
- Prasad, P. V., Boote, K. J., J. R. Allen y J. M. Thomas (2002). Effects of elevated temperature and carbon dioxide on seed-set and yield of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) . *Glob. Change Biol.* 8, 710-721.
- Prasil, O., Adir, N. y I. Ohad (1992). Dynamics of photosystem II; mechanism of photoinhibition and recovery processes. In *Photosystems. Structure, Function and Molecular Biology*. Amsterdam:Elsevier, pp295-348.

- Ramalho, J.C., Pons, T.L., Groeneveld, H.W., H.G. Azinheira y M.A. Nunes (2000). Photosynthetic acclimation of high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27, 43–51.
- Raschke, K. (1975). Stomatal action. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 309–40.
- Richards, R. A. (2000). Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* 51, 447–458.
- Sato, S., M. M. Peet y J. F. Thomas (2000). Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell Environ.* 23, 719–726.
- Schreiber, U., W. Bilger y C. Neubauer (1994). Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Shulze, E.D., Caldwell, M.M. (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, New York, pp. 49–70.
- Schreiber, U. y W. Bilger (1993). Progress in chlorophyll fluorescence research during the past years in retrospect. *Prog. Bot.*, 54, 151–173.
- Smart, R. E. (1974). "Aspects of water relations of the grapevine (*Vitis vinifera*)."
Am. J. enol. Vitic. 25,2, 84-91.
- Smart, R. E. y G. E. Bingham (1975). Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiol.* 53,2, 258–260.
- Smille, R.M. y R. Nott (1982). Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiol.* 70, 1049–1054.
- Souza, R. P., Machadoa, E. C., Silva, J. A., A. M. Lagôa, y J.A. Silveira (2004). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environ. Exp. Bot.* 51, 45-56.
- Strand, M y G. Öquist (1988). Effects of frost hardening, dehardening and freezing stress on in vivo chlorophyll fluorescence of scots pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Environ.* 11, 231–238.
- Taiz, L. y E. Zeiger (1998). *Plant physiology*. Sinauer Associates, Massachussets, second edition, 740-745 p.
- Tewari, A. K. y B. C. Tripathy (1998) Temperature-Stress-Induced Impairment of Chlorophyll Biosynthetic Reactions in Cucumber and Wheat. *Plant Physiol.*, 117, 851–858.
- Weis, E. y J. Berry (1988). Plants and high temperature stress, In: S.P. Long and F. I. Woodward (eds.), *Symp. Soc. Expt. Biol.* No. XXXXII, Cambridge Univ. Press, Cambridge, United Kingdom. pp. 329–346.

- Wellburn, A. R (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol*, 144, 307-313.
- Wild, A (1992). *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*, Mundi-Prensa.
- Willits, D. H y M. M. Peet (2001). Measurement of Chlorophyll Fluorescence as a Heat Stress Indicator in Tomato: Laboratory and Greenhouse Comparisons *J. AMER. SOC. HORT. SCI.*, 126,2,188–194.
- Wolf, F.T. (1956). Changes in chlorophylls a and b in autumn leaves. *Am. J. Bot*, 43, 714–718.
- Xin, H., Zhang, H., Chen, L., Li, X., Lian, Q., Yuan, X., Hu, X., Cao, L., X. He y M. Yi (2010). Cloning and characterization of HsfA2 from Lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Rep*, 29, 875–885.
- Yamada M., T.Hidaka, and H. Fukamachi. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Hort.*, 67, 39–48.
- Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H y K. Satoh (1997). Increase in the fluorescence F0 level and reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth. Res.*, 52, 57-64.
- Yan, K., Chen, P., Shao, H., L. Zhang y G. Xu (2011). Effects of Short-Term High Temperature on Photosynthesis and Photosystem II Performance in Sorghum. *Journal of Agronomy & Crop Science*. 197, 2011, 400–408.
- Raschke, K. (1975). Stomatal action. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 309-40.
- Young, A., D. Phillip y J. Savill (1997). Carotenoids in higher plant photosynthesis. In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, pp. 575–596.

CAPITULO IV

EXPRESIÓN BASAL Y EN RESPUESTA AL INCREMENTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE GENES Cphsfs EN *Carica papaya* L. cv. Maradol

IV.1 INTRODUCCIÓN

La respuesta al choque térmico es importante para las plantas, por ser sésiles; está regulada por una compleja relación entre diferentes componentes, donde los mecanismos aún no están claros (Hewezi *et al.*, 2008). En esta compleja interacción (figura IV.1) las proteínas Hsps (codificadas por genes hsps) actúan como chaperonas moleculares en el plegamiento, localización, distribución intracelular y marcaje de proteínas celulares para su degradación. Bajo estrés, las proteínas Hsps se unen a las proteínas no plegadas o aquellas propensas a la agregación, manteniéndolas en un estado plegable competente, durante la homeostasis proteica (Agashe y Hartl, 2000).

Sin embargo, los genes hsps necesitan de factores de transcripción del choque térmico (Hsfs) para que éstos regulen su expresión, éstos son los componentes terminales de una cadena de transducción de señales en Eucariotes implicados en el sensado y señalización del choque térmico. Regulan la activación de los genes sensibles al calor y de un gran número de factores que causan estrés químico y posiblemente regulan otros procesos celulares, como el desarrollo (Hewezi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 1999).

La primera evidencia para un regulador específico transcripcional Hsf, que pudiera unirse en la región promotora de genes hsps (elemento de choque térmico HSE) e inducir expresión, se obtuvo a través de estudios de interacción proteínas-ADN del único factor de transcripción Hsf de *D. melanogaster*, a partir de núcleos celulares aislados (Wu, 1984; Parker y Topol, 1984). A diferencia de los invertebrados donde es necesario sólo un gen hsf y su respectiva proteína Hsf (factor de transcripción) para la respuesta al estrés térmico, en las plantas y vertebrados se expresan múltiples genes hsfs (Akerfelt *et al.*, 2007; Nover *et al.*, 2001; Wu, 1995).

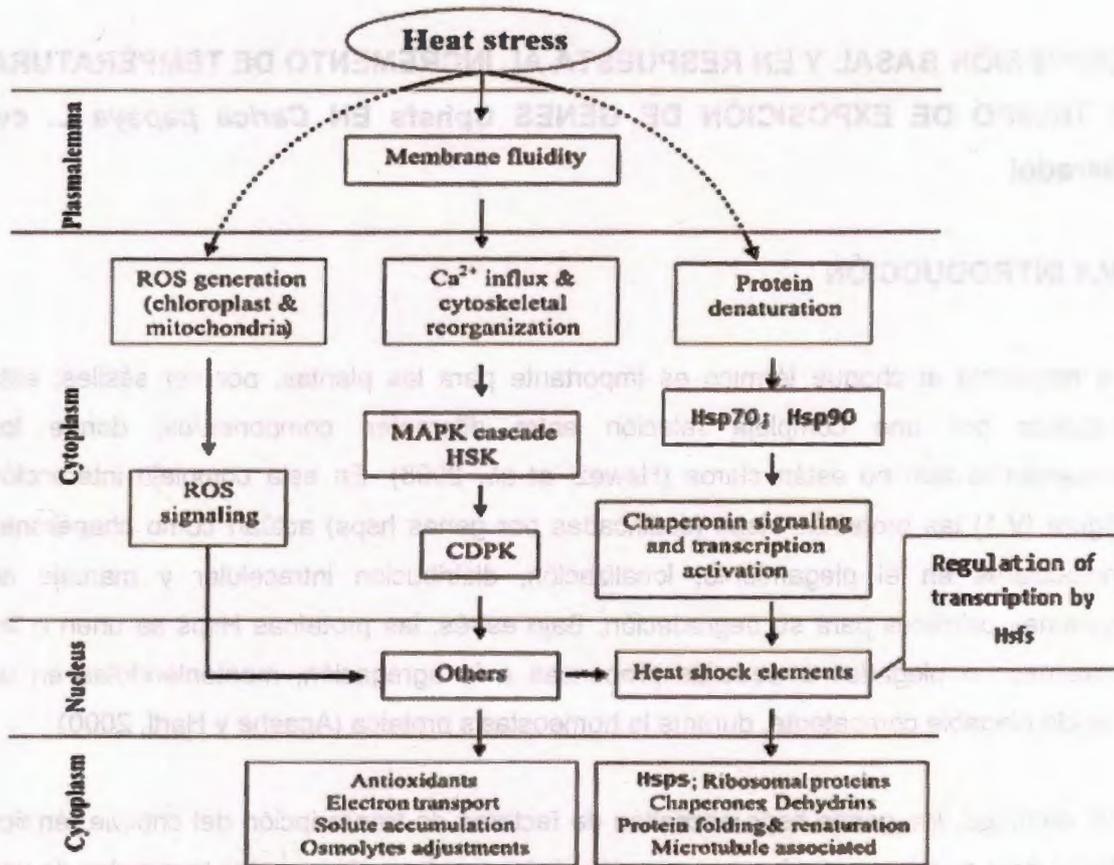


Figura IV.1 Mecanismos de respuesta al estrés por calor en plantas. Esquema propuesto por Sung (et al., 2003) modificado por Weng y Lai (2005), donde puede observarse a los factores de transcripción Hsfs como los reguladores centrales de los genes hsp. También son los componentes terminales de una cadena de transducción de señales que media la activación de los genes sensibles al calor y un gran número de factores que causan estrés oxidativo.

El número de genes hsf es muy diferente entre los distintos organismos eucariotas, por ejemplo, en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), insectos (*Drosophila melanogaster*) y nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) se encuentra un único gen hsf (Hsu et al., 2003; Jedlicka et al., 1997; Wiederrecht et al., 1988; Sorger y Pelham, 1988) mientras que en plantas es mayor el número como en *Arabidopsis* que se conocen 21 genes hsf, en tomate 24, en arroz 25 y 30 en maíz (Scharf et al., 2012).

Además del papel como reguladores positivos en la respuesta al choque térmico de los factores de transcripción Hsfs, los genes hsfs que codifican para éstos, parecen tener, según estudios genéticos, funciones pleiotrópicas, como en el caso del único gen hsf tanto en *S. cerevisiae* como en *D. melanogaster*. En levadura la expresión de dicho gen es esencial para el crecimiento, en ausencia de condiciones estresantes (Lohmann *et al.*, 2004), mientras que en *D. melanogaster* es indispensable para la viabilidad general y también es necesario para oogénesis, el desarrollo larvario y la supervivencia en condiciones extremas de estrés (Jedlicka *et al.*, 1997).

En animales vertebrados se han identificado cuatro genes hsfs (hsf1-hsf4), más allá de su papel en la respuesta al choque térmico, el gen hsf1 es requerido para la embriogénesis temprana, durante el desarrollo extraembrionario, el crecimiento postnatal y protección durante la respuesta inflamatoria (Christians *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 1999).

Los genes hsf2 y hsf4 tienen funciones más especializadas, ya que su expresión y la actividad se limitan a ciertas etapas de desarrollo y tejidos (Kallio *et al.*, 2002; Pirkkala *et al.*, 2001). Interesantemente, cada uno de estos 2 genes codifican una diferente isoforma, que al parecer actúan como activador y represor de la transcripción respectivamente (Pirkkala *et al.*, 2001; Frejtag *et al.*, 2001). El gen hsf3 responde al estrés por calor y codifica para el factor de transcripción Hsf3, el cual se trasloca al núcleo y puede activar genes no típicos de respuesta al calor como PDZK3 y PROM2 (Fujimoto *et al.*, 2010).

A diferencia de los vertebrados donde se usan sólo números, en plantas para referirnos a los genes hsfs o a los factores de transcripción Hsfs, se anteponen las iniciales del nombre científico, que consiste en la especie y género y al final también se indica la clase a la que pertenecen. Hasta ahora se han identificado tres clases A, B y C. Aunque la literatura científica acerca de la respuesta del choque térmico es mayor en animales, en plantas se sabe que los factores de transcripción Hsfs de la clase A actúan como activadores transcripcionales mientras que los de la clase B y C actúan como coactivadores o represores de la transcripción (Bharti *et al.*, 2004).

Otra diferencia es el hecho de conocerse en plantas la existencia de un regulador maestro de la respuesta al choque térmico, como el factor de transcripción denominado LpHsfA1a en tomate *Lycopersicon peruvianum* (hoy reclasificado como *Solanum peruvianum*) actúa como un regulador maestro de la biosíntesis de otros factores de transcripción Hsfs como LpHsfA2 y LpHsfB1 así como la producción de proteínas Hsps manteniendo la termotolerancia y regresando la expresión de genes housekeeping después del estrés (recuperación), lo que indica que existe un control jerárquico entre los diferentes factores de transcripción Hsfs en la respuesta al choque térmico de las plantas (Mishra *et al.*, 2002).

En *A. thaliana* los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b son los principales reguladores de la activación inmediata de la transcripción génica en el estrés del choque térmico y en consecuencia determinan la cinética de retroalimentación negativa, que es responsable de la temporalidad de la expresión génica (Lohmann *et al.*, 2004).

Los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b son considerados como reguladores primarios (tempranos) en la célula y pueden llegar a ser remplazados por factores de transcripción Hsfs tardíos, los cuales actúan después en la duración de la respuesta del estrés térmico (Wunderlich *et al.*, 2007; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004).

El gen AthsfA2 se considera “tardío”, su expresión aumenta bajo estrés térmico, su respectivo factor de transcripción parece regular la expresión de un grupo de genes blanco que ampliamente se sobrelapan con aquellos regulados por los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b, (Wunderlich *et al.*, 2007). El factor de transcripción AtHsfA2 es esencial para mantener la tolerancia adquirida pero no para inducirla (Chang *et al.*, 2007).

Los factores de transcripción Hsfs de la clase A pueden activarse asimismo, es decir pueden activar a los genes hsfs de la clase A, a otros genes hsfs y genes relacionados al estrés, en contraste los factores de transcripción de la clase B y C no tienen función evidente como activadores de su propia transcripción (Kotak *et al.*, 2004; Czarnecka-Verna *et al.*, 2004, 2000) y hasta ahora se sabe menos de ellos.

Los factores de transcripción Hsfs de la clase B, difieren de la clase A por una variación estructural en los dominios de oligomerización y de unión al ADN así como la falta de un motivo AHA, éste último se requiere para la función de la activación transcripcional y es lo que diferencia a los factores de transcripción Hsfs de la clase A, suponiendo así, que los de la clase B no se pueden auto activar y requieren para ello a los de la clase A (Koskull-Döring *et al.*, 2007) sin embargo su función al parecer es de coactivación y supresión.

En el genoma de *Arabidopsis* solo hay cinco genes hsfs diferentes de la clase B, dos de los cuales son considerados con funciones tempranas (AthsfB3 y AthsfB4) y los otros tres son considerados que actúan como hsfs tardios (AthsfB1, HsfB2a, HsfB2b) (Schramm *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004). En el caso de los factores de transcripción Hsfs de la clase C sólo se conoce 1 en *Arabidopsis* y tomate, 4 en arroz y 5 en maíz; la información sobre esta clase es limitada, no pueden activarse por sí mismos por carecer del motivo AHA.

En este capítulo se evaluó la expresión de genes hsfs de *C. papaya* L. cv. Maradol por RT-PCR semi cuantitativo primeramente a partir de diversos tejidos de plantas adultas colectados previamente de una plantación comercial y seguidamente a partir de tejidos colectados de plantas jóvenes expuestas a 2 experimentos tomando como referencia el experimento de la determinación del punto de estrés térmico en el capítulo anterior y en base a esto se caracterizó el efecto de altas temperaturas sobre los perfiles de expresión de tales genes en condiciones de estrés moderado, en el punto de estrés térmico (estrés severo) así como en la etapa post estrés (estado de recuperación).

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1 Material vegetal

IV.2.1.1 Colecta de tejido vegetal adulto

Para el estudio de la expresión basal se colectó tejido vegetal de plantas adultas de *C. papaya* L. cv. Maradol (de 1 año de edad) en una plantación comercial, denominada Rancho Alegre (Tizimín, Yucatán, México) (N 21° 18.219', W 087° 46.179'), al momento

de la colecta el día fue soleado con una temperatura de 35.8 °C y una densidad de flujo de fotones 10004 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se colectaron por separado y en bolsas de papel aluminio los siguientes tejidos: hoja, peciolo, pétalo, fruto inmaduro, fruto maduro y raíz, éstos se guardaron en nitrógeno líquido hasta su traslado al Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, para almacenarlos en ultracongelador a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

IV.2.1.2 Germinación y edad fisiológica

Semillas de plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol fueron germinadas, en vasos de unicel (de 8 cm de diámetro y 11 cm de altura) utilizando como sustrato agrolita y peat moss (1:1), la semilla se colocó a 1 cm de profundidad. Dentro del invernadero, se dispuso de una cámara de germinación protegida con malla antiáfidos, temperatura promedio de 32 °C, densidad de flujo de fotones promedio de 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y humedad relativa del 80 %.

Cuando las plantas alcanzaron una edad de 65 días y una altura aproximada de 18 cm fueron transferidas y aclimatadas durante 5 días en un cuarto de cultivo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, a una temperatura de 25 °C \pm 1 °C día/noche, fotoperíodo de 12/12 h, densidad de flujo de fotones de 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y humedad relativa del 80 %. El riego consistió de 10 ml de agua destilada cada tercer día durante los primeros 25 días, mientras que el tiempo restante, el riego fue de 15 ml cada segundo día, de una solución (1ml/L) nutritiva comercial (Bayfolan®Forte líquido, Bayer).

Como se describió en el capítulo de análisis fisiológico, el término que mejor caracterizó a las plantas usadas después de la aclimatación, fue el de plantas jóvenes (70 días) en relación al tejido vegetal colectado de plantas adultas. A los 70 días las plantas jóvenes tuvieron suficiente tejido para los análisis moleculares, las colectas se llevaron a cabo en el estrato medio de las plantas jóvenes donde se situaron las hojas más jóvenes completamente expandidas, esto fue en el 7° y 8° nudo incluyendo en el conteo a los cotiledones desde abajo hacia arriba. Cuando se cortó la raíz, se le retiró el sustrato con agua destilada y la muestra se tomó de la parte media.

IV.2.2 Experimentos

Determinado el punto (temperatura y tiempo de exposición) del estrés térmico en el Capítulo III que fue a las 4 h en recuperación después de someter las plantas a 50 °C, se realizaron 2 experimentos posteriores para evaluar los efectos bajo exposición térmica en la expresión de los genes *hsfs* en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol en condiciones de estrés moderado, en el punto de estrés térmico y post estrés.

IV.2.2.1 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 hora, sin recuperación

Un primer lote de plantas jóvenes, se aclimataron previamente a 25 °C, para formar 4 grupos. Un grupo sirvió como control manteniéndose a 25 °C mientras que los 3 grupos restantes se expusieron cada uno, a una sola temperatura dentro de una cámara térmica durante 1 h. Para conseguir el choque térmico las temperaturas dentro de la cámara, al momento de introducir cada grupo, fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C respectivamente.

Cada grupo consistió de 5 plantas jóvenes, al término de cada exposición (sin regresar a 25 °C) se colectaron en bolsas de papel aluminio y por separado hojas, peciolo, tallo y raíz, se guardaron en ultra congelador a -80 para su análisis molecular posterior.

IV.2.2.2 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación

El segundo lote de plantas jóvenes, se aclimataron previamente a 25 °C, para formar 3 grupos; un grupo se mantuvo a 25 °C como control, los 2 grupos restantes se introdujeron durante 4 h en la cámara térmica la cual tenía una temperatura de 50 °C. Después de concluir el tratamiento las plantas jóvenes se regresaron a 25 °C (recuperación). Las mediciones y colectas del tejido vegetal se realizaron a uno de los grupos, después de 4 h de recuperación y en el grupo restante se realizaron los análisis a las plantas 1 semana después de la recuperación a 25 °C.

Cada grupo consistió de 5 plantas jóvenes, en estado de recuperación (4 h y 1 semana) se colectaron por separado y en bolsas de papel aluminio hoja, peciolo, tallo y raíz, se guardaron en ultra congelador a -80 para su análisis molecular posterior.

IV.2.3 Análisis molecular

IV.2.3.1 Análisis de calidad de ARN

Dado que la contaminación de las muestras con impurezas orgánicas e inorgánicas y proteínas afecta de forma significativa la sensibilidad y especificidad del resultado, se verificó la calidad del ARN. Como indicador de la cantidad del ARN se utilizó una absorbancia a 260 nm y el grado de pureza se determinó en base a la relación de absorbancia A260/280 utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, USA) a partir de extracciones realizadas en 4 tejidos: hoja, peciolo, tallo y raíz. Finalmente se calculó el rendimiento.

IV.2.3.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó un protocolo previamente establecido en el laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular que de forma general comprende el pesaje de la muestra (entre 100 a 400 mg), molienda con mortero y nitrógeno líquido, extracción con CTAB previamente calentado a 60 °C, purificación del ARN con disolventes de diferente grado (°) de polaridad (etanol, cloroformo-alcohol isoamílico) y soluciones salinas (como cloruro de litio). Centrifugación y precipitación de ARN, proceso que finalizó con el análisis de integridad del ARN (electroforesis) y cuantificación espectrofotométrica (Nanodrop). Finalmente se almacenó en ultracongelador a -80 °C hasta su uso.

IV.2.3.2 Síntesis de ADNc y amplificación de genes a partir de ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima SuperScript II[®] (Invitrogene), de forma general la reacción de síntesis se efectuó a partir de 500 ng de ARN en mezcla con el buffer 5x FirstStrand, DTT (0.1 mM), MgCl₂ (50 mM), dNTPs (10 mM), RNase Out, y Reverse Transcriptase RT en un programa de calentamiento a 25 °C (5 min), 42 °C (1 h 45 min) y 70 °C (15 min) para ser almacenado posteriormente a -20 °C. Para la amplificación específica se emplearon oligos de genes hsfs previamente enviados a sintetizar (Sigma) y adicionalmente se usaron como control, oligos de un gen marcador constitutivo (EF1 α).

IV.2.3.3 Extensión de genes

Para la extensión de los genes se usaron reactivos de la casa comercial Invitrogene. Se colocó en un tubo Eppendorf 1.5 μ L de ADNc en solución con Buffer PCR, $MgCl_2$ (50 mM), dNTPs (10 mM), 1.5 μ L del oligo Forward, 1.5 μ L del oligo Reverse, 1.0 μ L TaqPolimerasa y agua para ajustar a un volumen final de 50 μ L. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler gradient 5333 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) mediante un programa que constó de una etapa de desnaturalización a 95 °C (3 min), seguido de 34 ciclos con desnaturalización a 95 °C (30 seg), alineación a 56 °C (30 seg), extensión 72 °C (1 min) y una etapa de extensión final a 72 °C (10 min).

La resolución de los productos amplificados de los genes *hsfs* en *C. papaya* L. cv. Maradol, se realizó mediante electroforesis (75 V, durante 50 min), en un gel de agarosa al 1.2% (p/v) en TAE (1x) y solución de bromuro de etidio.

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1 Análisis de calidad de ARN

Las lecturas del ARN extraído en hoja, peciolo, tallo y raíz de plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas durante diferentes temperaturas: 25 °C (como control) y 30 °C, 40 °C y 50 °C (como tratamientos térmicos) correspondientes al experimento de Exposición térmica de plantas jóvenes durante 1 h, sin recuperación pueden observarse en el Cuadro IV.1. Mientras que las lecturas para el experimento de exposición térmica de plantas jóvenes a 50 °C durante 4 h con recuperación de 4 h o 1 semana, puede verse en el Cuadro IV.2. Por recuperación se entiende que al término de la exposición las plantas fueron regresadas a 25 °C; en este experimento la temperatura usada como control fue 25 °C, de igual forma se analizaron los 4 tejidos evaluados anteriormente.

Cuadro IV.1 Calidad del ARN, en diferentes tejidos de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 3 temperaturas (30 °C, 40 °C y 50 °C) durante 1 hora, sin recuperación.

Tejido	Tratamiento	Peso muestra	260 nm	260/280 nm	Concentración ng/μL	Rendimiento μg ARN/mgPF
Hoja	25 °C	0.56	37.38	2.09	1495.10	8.03
	30 °C	0.59	38.85	2.09	1553.90	7.93
	40 °C	0.59	36.10	2.12	1444.10	7.35
	50 °C	0.57	34.22	2.07	1368.70	7.15
Peciolo	25 °C	0.54	15.81	2.07	632.40	3.52
	30 °C	0.41	11.58	2.03	463.10	3.35
	40 °C	0.42	17.19	2.10	687.60	4.92
	50 °C	0.46	10.36	2.05	414.60	2.70
Tallo	25 °C	0.51	41.29	1.96	1651.60	9.66
	30 °C	0.52	13.92	2.00	556.90	3.20
	40 °C	0.59	24.19	2.07	967.50	4.91
	50 °C	0.53	16.72	2.12	668.70	3.75
Raíz	25 °C	0.61	2.79	2.08	111.80	4.47
	30 °C	0.73	17.57	2.11	702.80	0.71
	40 °C	0.72	3.94	2.10	142.10	3.51
	50 °C	0.58	8.01	2.04	320.2	1.56

Cuadro IV.2 Calidad del ARN, en 4 tejidos de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol expuestas a 50 °C durante 4 h.

Tejido	Tratamiento	Peso muestra	260 nm	260/280 nm	Concentración ng/μL	Rendimiento μg ARN/mgPF
Hoja	25°C (4 h)	0.72	17.235	2.08	689.4	0.72
	50°C (4 h)+4 h Rec	0.71	7.575	2.14	655.9	0.76
	50°C (4 h)+1 Sem Rec	0.69	10.474	2.03	1392.1	0.35
Peciolo	25°C (4 h)	0.72	2.241	2.07	96.6	5.17
	50°C (4 h)+4 h Rec	0.74	10.448	1.95	417.9	1.19
	50°C (4 h) +1 Sem Rec	0.70	7.709	2.03	308.4	1.62
Tallo	25°C (4 h)	0.69	4.776	2.06	191	2.61
	50°C (4 h)+4 h Rec	0.72	8.562	1.96	342.5	1.45
	50°C (4 h) +1 Sem Rec	0.73	4.682	2.06	187.3	2.66
Raíz	25°C (4 h)	0.77	15.675	2.09	627	0.79
	50°C (4 h)+4 h Rec	0.76	7.345	2.05	293.8	1.7
	50°C (4 h)+1 Sem Rec	0.75	3.93	2.08	157.2	3.18

IV.3.2 Expresión basal en plantas adultas

En los diferentes tejidos colectados de plantas adultas de *C. papaya* L. cv. Maradol (1 año de edad) en una plantación comercial, se encontraron presentes los 6 genes hsfs evaluados (figura IV.2). Los genes CphsfA1a, CphsfA2 y CphsfB2b presentaron una mayor expresión basal en todos los tejidos evaluados en comparación con los genes CphsfA1b y CphsfB1, los cuales presentaron la menor expresión basal; sin embargo en estos últimos se observó un incremento de expresión en fruto inmaduro. El gen CphsfC1 presentó una expresión basal bastante uniforme en los diferentes tejidos, excepto en fruto inmaduro y maduro, donde la expresión basal disminuyó.

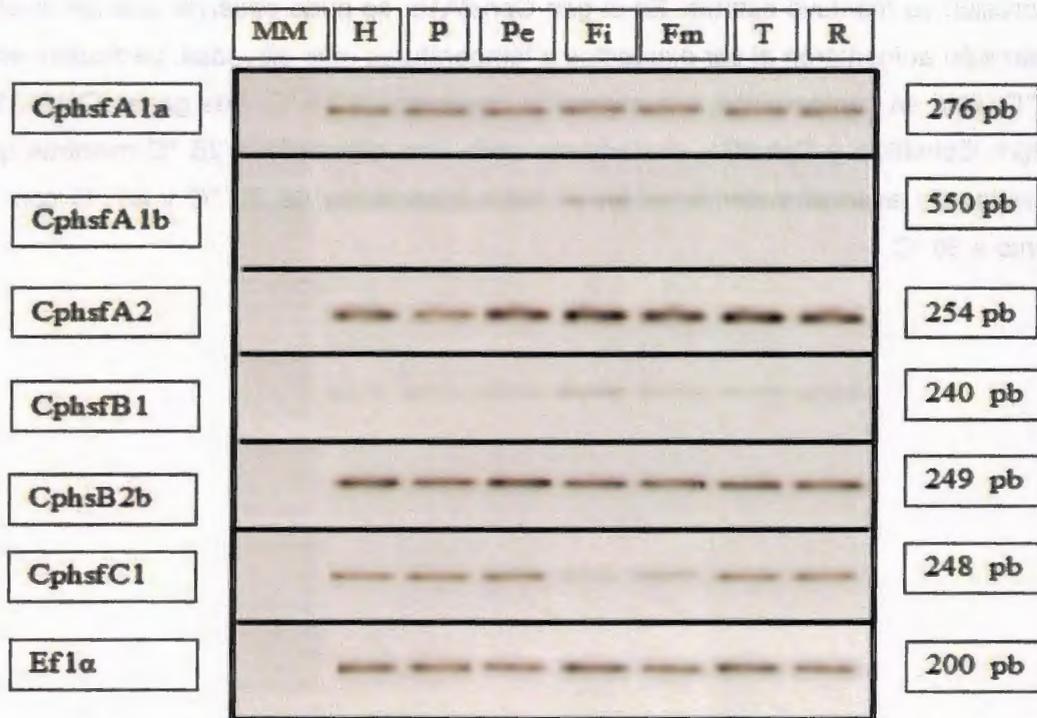


Figura IV.2 Expresión basal de 6 genes hsfs en diferentes tejidos de plantas adultas de *C. papaya* L. cv. Maradol. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsfs. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. En una plantación comercial se colectaron diferentes tejidos de plantas adultas éstos se indican en los recuadros de la parte superior como sigue: H) hoja, P) peciolo, Pe) pétalo, Fi) fruto inmaduro, Fm) fruto maduro, T) tallo y R) raíz. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb; el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

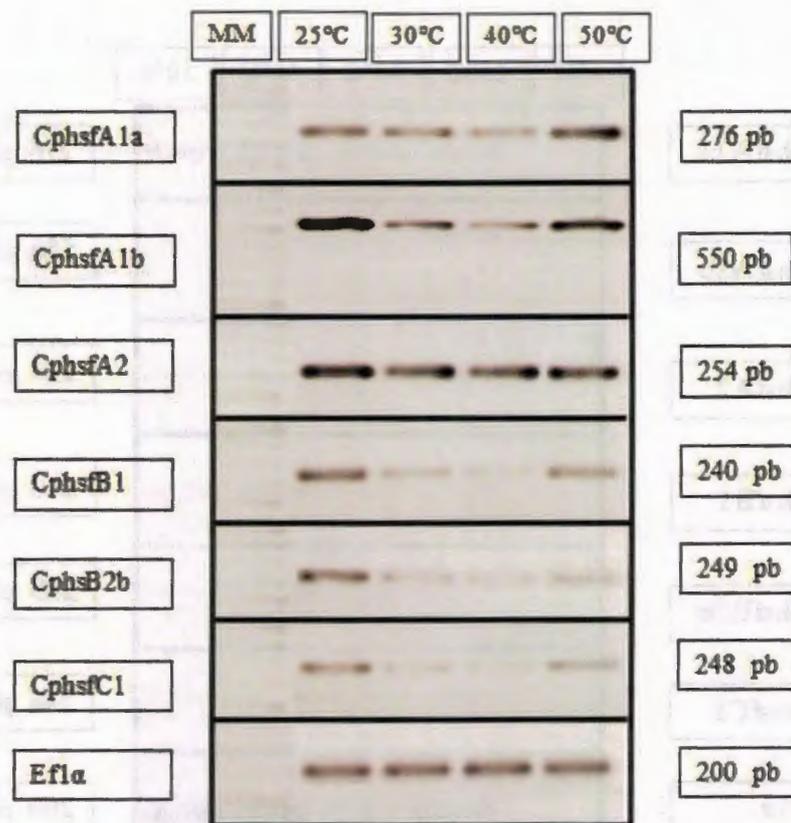


Figura IV.3 Expresión de 6 genes hsfs en hoja de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

En peciolo (figura IV.4) el gen con los mayores niveles de expresión en todas las temperaturas evaluadas fue CphsfA1a, en relación a los genes restantes y sus niveles de expresión a 30 °C, 40 °C y 50 °C fueron mayores en comparación con la expresión a 25 °C. El gen CphsfA1b presentó una disminución de sus niveles de expresión en relación a 25 °C conforme aumentó la temperatura. El gen CphsfA2 aparentemente mantuvo una expresión uniforme conforme aumentó la temperatura, mientras que los genes CphsfB1, CphsfB2b y CphsfC1 tuvieron solamente un ligero aumento a 40 °C.

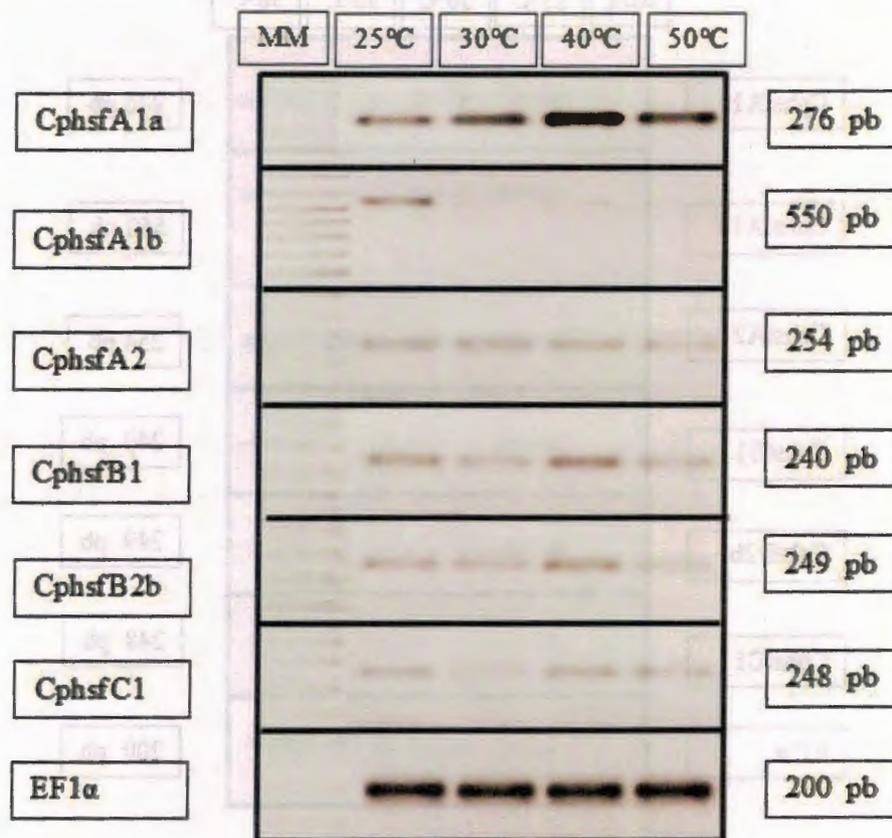


Figura IV.4 Expresión de 6 genes hsfs en peciolo de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

De todos los genes evaluados en tallo (figura IV.5) el gen que sobresalió con los mayores niveles de expresión en las temperaturas evaluadas fue CphsfA2, también presentó una expresión uniforme aún expuestos a altas temperaturas. Los genes CphsfA1a y CphsfA1b presentaron un incremento en el nivel de expresión conforme aumentó la temperatura en particular a 40 °C y 50 °C. En cambio CphsfB1 aparentemente tuvo una disminución en el nivel de expresión a 30 °C y un incremento a 40 °C. Los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron los menores niveles de expresión a 30 °C y 50 °C y un incremento a 40 °C.



Figura IV.5 Expresión de 6 genes hsfs en tallo de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

En raíz (figura IV.6) los genes CphsfA1a y CphsfB2b presentaron una disminución en sus niveles de expresión a 30 °C y 50 °C, comparado con 25 °C, mientras que a 40 °C el nivel de expresión fue similar a la observada a 25 °C. El gen CphsfA1b disminuyó a 40 °C mientras que el gen CphsfA2 presentó una disminución a 30 °C y su nivel de expresión aumentó conforme aumentó la temperatura, en especial a 50 °C. Interesantemente CphsfB1 presentó una expresión estable aun cuando aumentó la temperatura. El gen CphsfC1 aumentó su nivel de expresión a 40 °C mientras que los niveles de expresión a 30 °C y 50 °C fueron muy similares al nivel de expresión presentado a 25 °C.

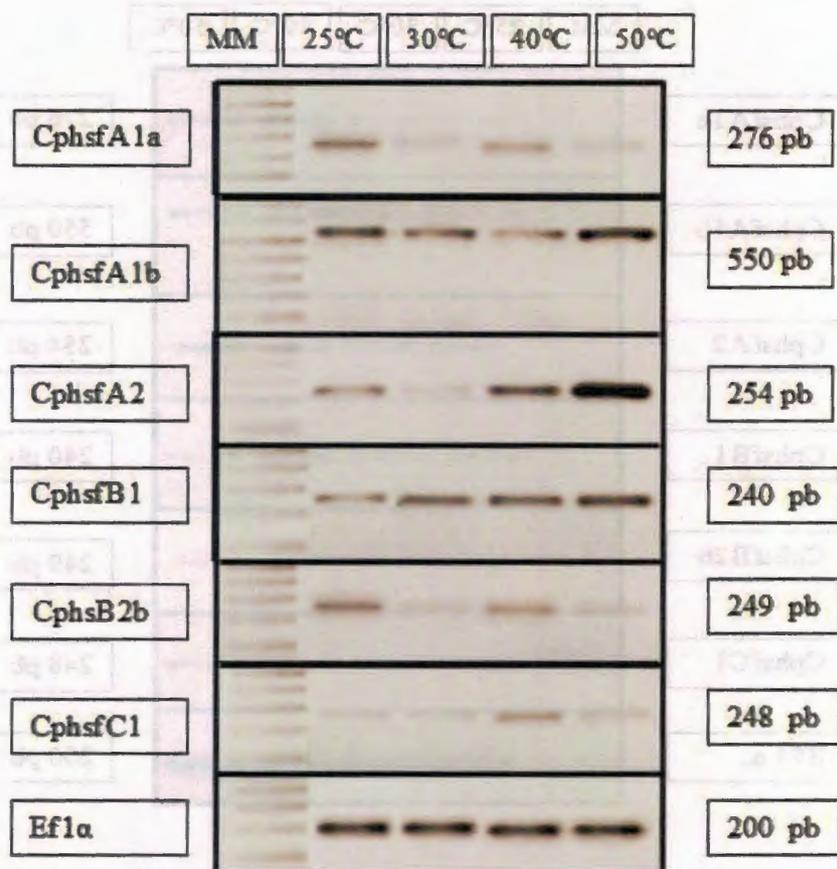


Figura IV.6 Expresión de 6 genes hsfs en raíz de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 1 h. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a diferentes temperaturas (recuadros superiores) éstas fueron 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 h mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

IV.3.4 Exposición térmica de plantas jóvenes durante 4 horas, con recuperación

En este experimento la temperatura control fue de 25 °C, las plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol se sometieron a una temperatura de 50 °C durante 4 h y se regresaron a 25 °C (recuperación), entonces el análisis molecular se realizó a las 4 h de recuperación o después de 1 semana de recuperación a 25 °C en 4 tejidos: hoja, peciolo, tallo y raíz (figuras IV.7-IV.10). Vale la pena recalcar que en el análisis fisiológico se

determinó como punto de estrés térmico justo a las 4 h de recuperación y no al término de la exposición a 50 °C (durante 4 h), sugiriendo que muchos de los daños no se dan de manera inmediata al término del evento estresante sugiriendo que algunos de los genes hsf's evaluados pudieran aumentar su expresión en etapas posteriores al estrés.

En hoja (figura IV.7) los genes CphsfA1a, CphsfB2b y CphsfC1, presentaron mayor expresión a 1 semana de recuperación después de ser expuestas a 50 °C en comparación con el nivel de expresión observado a las 4 h de recuperación, sin embargo en el gen CphsfA1a el nivel de expresión observado a las 4 h de recuperación fue muy similar al nivel de la expresión a 25 °C, mientras que los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron una ligera disminución en el nivel de expresión observado a las 4 h de recuperación en comparación al nivel de la expresión a 25 °C.

Interesantemente el gen CphsfA2 presentó un aumento de expresión en el punto estresante (4 h de recuperación) en comparación con el nivel de expresión observado a 25 °C, este mismo nivel de expresión se mantuvo a 1 semana de recuperación. Esto contrasta con el gen CphsfA1b cuyo nivel de expresión disminuyó a 4 h y 1 semana, de recuperación respectivamente, en comparación a la expresión observada a 25 °C. El gen CphsfB1, presentó un aumento en su expresión a las 4 h de recuperación pero una disminución a 1 semana de recuperación.

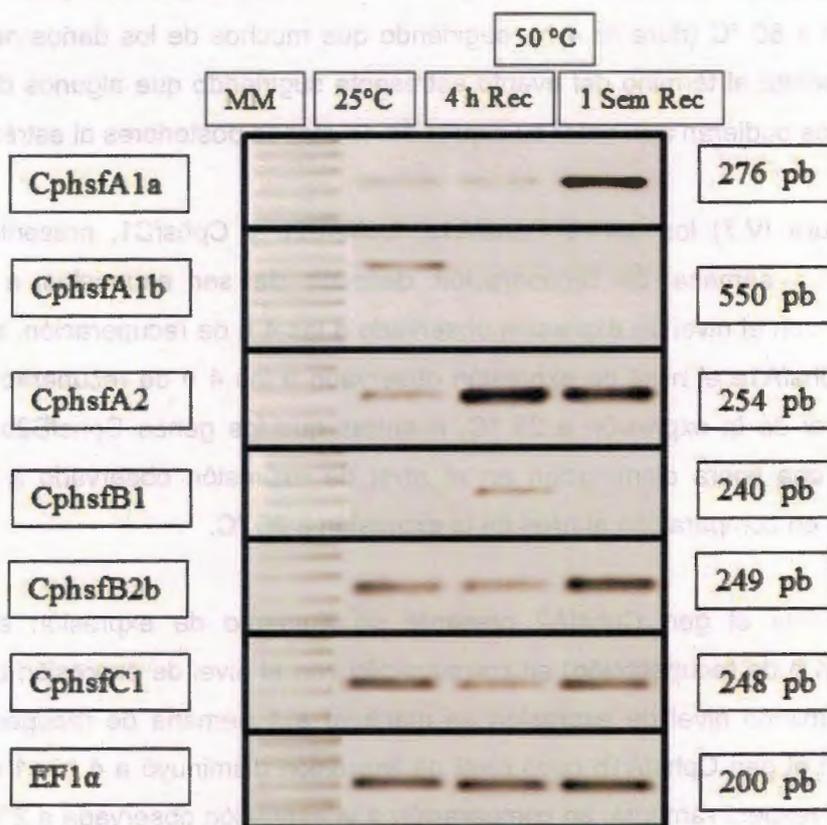


Figura IV.7 Expresión de 6 genes hsf's en hoja de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

En peciolo (figura IV.8) el gen CphsfA1a presentó un aumento a 1 semana de recuperación en comparación con la expresión a 25 °C, mientras que a 4 h de recuperación el nivel fue similar a lo encontrado a 25 °C. En relación a la expresión a 25 °C del gen CphsfA1b, sus niveles de expresión aumentaron conforme aumentó el tiempo de recuperación después de haber sometido las plantas a 50 °C, es decir fue mayor a 1 semana de recuperación.

El gen CphsfA2 presentó aumento en su nivel de expresión a las 4 h de recuperación e interesantemente este nivel fue similar a 1 semana de recuperación. En relación a la expresión a 25 °C CphsfB1 presentó un aumento de expresión a las 4 h de recuperación y luego disminuyó a 1 semana de recuperación a un nivel similar al presentado en la expresión observada a 25 °C. Los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron el mismo nivel de expresión a 4 h y 1 semana de recuperación en comparación a la expresión observada a 25 °C.

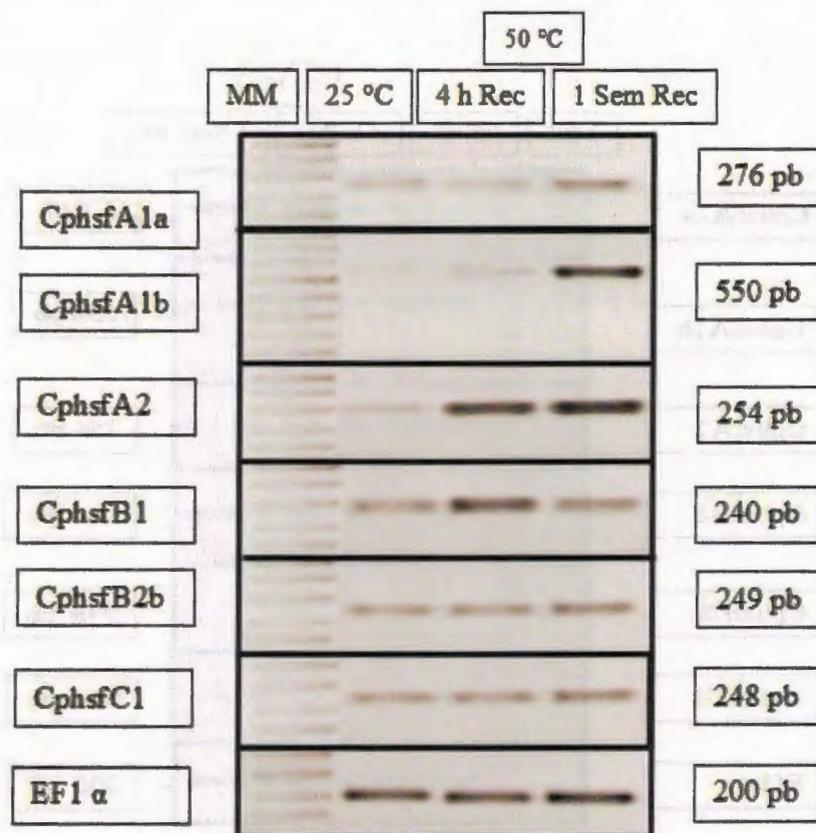


Figura IV.8 Expresión de 6 genes hsf en peciolo de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

En tallo (figura IV.9), en comparación con 25 °C, los genes CphsfA1a y CphsfB1, presentaron un aumento de expresión a las 4 h y 1 semana de recuperación mientras que en el gen CphsfA1b, su expresión disminuyó a 4 h y 1 semana de recuperación. En cambio los genes CphsfA2 y CphsfB2b presentaron un aumento de expresión a 4 h de recuperación pero una disminución a 1 semana de recuperación. El gen CphsfC1 presentó una disminución de la expresión a las 4 h de recuperación en comparación con 25 °C y un nivel de expresión similar a 1 semana de recuperación a lo observado a 25 °C.

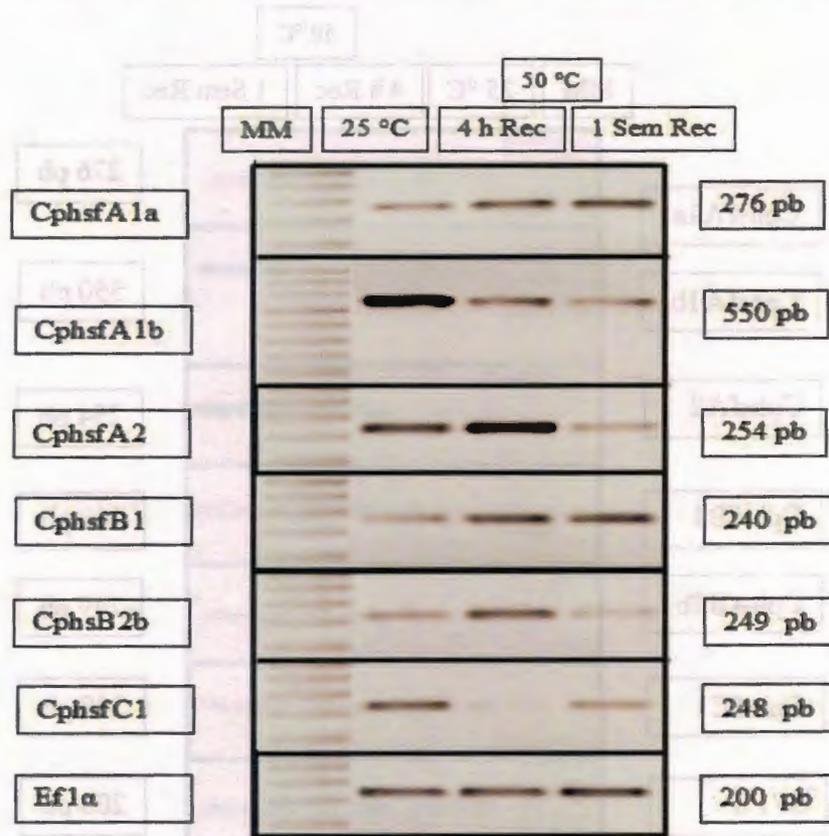


Figura IV.9 Expresión de 6 genes hsf en tallo de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1α. Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

En raíz (figura IV.10) el gen CphsfA1a mantuvo una expresión muy similar tanto a 25 °C como a 4 h y 1 semana de recuperación respectivamente mientras que en los genes CphsfA1b y CphsfB1 su expresión fue similar tanto a 25 °C como a las 4 h de recuperación pero con una disminución a 1 semana de recuperación. El gen CphsfA2 presentó un aumento en su expresión a las 4 h de recuperación en relación a la a 25 °C y un nivel similar a 25 °C cuando se evaluó 1 semana de recuperación. En cambio los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron disminución de su expresión en relación a 25 °C, más evidente en CphsfC1 a 1 semana de recuperación.

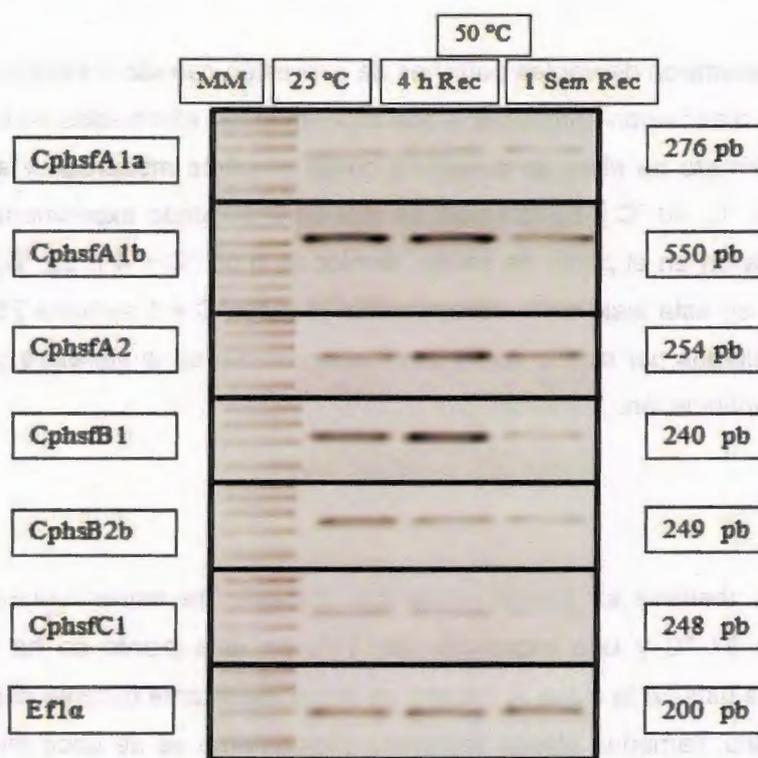


Figura IV.10 Expresión de 6 genes hsf en raíz de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol bajo exposición térmica de 50 °C durante 4 h. En los recuadros a la izquierda del gel se observa el nombre de cada gen hsf. Se utilizó como control el gen constitutivo EF1 α . Las plantas fueron expuestas a una temperatura de 50 °C durante 4 h y luego fueron regresadas a 25 °C (recuperación). El análisis de expresión se realizó en tejido colectado de plantas a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (recuadros superiores) mientras que la temperatura control fue de 25 °C. Se indican en los recuadros a la derecha del gel el tamaño del fragmento en pb, el marcador de peso molecular (MM) utilizado fue 1 kb plus.

IV.4 DISCUSIÓN

Resultó interesante encontrar expresión basal de los 6 genes CphsfA1a, CphsfA1b, CphsfA2, CphsfB1, CphsfB2b y CphsfC1 en plantas adultas de *Carica papaya* L. cv. Maradol en los 7 tejidos evaluados: hoja, peciolo, pétalo, fruto inmaduro, fruto maduro, tallo y raíz, aunque se debe resaltar que las plantas fueron colectadas en una plantación comercial en un día soleado a una temperatura de 35.8 °C y una densidad de flujo de fotones 10004 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

También se encontraron diferentes patrones de expresión cuando las plantas jóvenes con una edad de 70 días fueron sometidas a dos experimentos, efectuados en base al análisis fisiológico. El primero de ellos se consideró como el estrés moderado y se evaluaron 3 temperaturas 30 °C, 40 °C y 50 °C mientras que en el segundo experimento se evaluó el patrón de expresión en el punto de estrés térmico (4 h 50 °C + 4 h 25 °C) y posterior al estrés, llamado en esta tesis como recuperación (4 h 50 °C + 1 semana 25 °C). Se eligió discutir los resultados por clases como suele encontrarse en la literatura científica como se muestra a continuación.

IV.4.1 Clase A

En *Arabidopsis thaliana* es común encontrar trabajos de estrés donde se usa una temperatura de 37 °C y una exposición de 1 h, en esta planta se ha mostrado que diferentes genes hsfA de la clase A, juegan un papel importante durante diferentes etapas del estrés térmico, llamadas etapas temprana (típicamente va de unos minutos a 2 h) y tardía (2 h en adelante). Siendo una planta de clima templado estos términos podrían llegar a ser diferentes cuando se le compara con otras especies que crecen en climas tropicales, como *Carica papaya* L. cv. Maradol, en la cual los tiempos y temperaturas de exposición para lograr el estrés son mayores.

En *Arabidopsis* los genes AthsfA1a y AthsfA1b a través de sus respectivos factores de transcripción regulan la inducción de un número de genes hsp en la fase temprana de la respuesta al estrés pero sin ser los únicos involucrados en esa regulación.

Para evaluar la expresión de los genes *AthsfA1a* y *AthsfA1b*, Lohmann, *et al.*, (2004) usaron hojas de plantas de *A. thaliana* con una edad de 3-4 semanas crecidas a una temperatura control de 20 °C, lo interesante es que no expusieron las plantas completas como se realizó en esta tesis, sino que las hojas fueron colectadas y expuestas en una cámara a 37 °C durante 10 min, 30 min, 60 min y 180 min. La expresión de dichos genes se encontró en todos los tiempos evaluados aún en las plantas mantenidas a 22 °C, la expresión disminuyó a los 10 min y 30 min, pero aumentó a los 60 min (1 h, parte de la fase temprana) para ambos genes, sin embargo la expresión disminuyó cuando la duración fue de 180 min (2 h considerada como inicio de la fase tardía) en el caso del gen *AthsfA1b* mientras que la expresión de *AthsfA1a* aumentó.

De igual forma, se evaluó la cantidad de ARNm de genes típicos del estrés térmico como *hsp17.6A*, *hsp18.2*, *hsp70*, *hsp83.1* y *hsp101* en plantas wild type y plantas con doble mutación en los genes *AthsfA1a*-*AthsfA1b*, en las plantas wild type dichos genes presentaron aumento de expresión, el pico máximo se notó a 1 h y luego descendió. En las plantas con doble mutación hubo poca acumulación de ARNm en la fase temprana pero a las 2 h los niveles fueron comparables a la planta wild type, lo que sugirió la participación de otros factores de transcripción hsf involucrados en fases posteriores, con lo que quedó demostrado que los genes *AthsfA1a* y *AthsfA1b* son reguladores en la fase temprana y constitutivos en *Arabidopsis*.

Trabajos posteriores como Nishizawa (*et al.*, 2009), Chang (*et al.*, 2007), Nishizawa (*et al.*, 2006) y Schramm (*et al.*, 2006) también concluyeron que los genes *AthsfA1a* y *AthsfA1b* como sus respectivos factores de transcripción son “tempranos y funcionalmente redundantes”, al regular a través de un solapamiento parcial un grupo común de genes como *Apx2*, *hsp26.5*, *hsp25.3*, *hsp22.0*, *hsp18.1*, *hsp70*, *hsp101* y *DNAJ* en la respuesta al estrés térmico.

La relación entre los factores de transcripción *AtHsfA1a* y *AtHsfA1b* fue estudiada por Li, *et al.*, (2010) quienes demostraron que pueden interactuar uno con el otro y más interesante es que estos dos interactúan con el factor de transcripción *AtHsfA2* a través de su dominio de oligomerización. Una interacción que depende del dominio de oligomerización también se ha observado en tomate *Lycopersicon peruvianum* (hoy

reclasificado como *Solanum peruvianum*) en los factores transcripcionales LpHsfA1a y LpHsfA2 (Chan-Schamnet *et al.*, 2009) y en AtHsfA4 y AtHsfA5 de Arabidopsis (Baniwal *et al.* 2006) en ambos casos existe una gran especificidad en cada par de Hsf.

Según los estudios de Lohmann (*et al.*, 2004) y Li (*et al.*, 2010) se podría suponer que los genes estudiados en esta tesis CphsfA1a y CphsfA1b en *C. papaya* L. cv. Maradol podrían actuar en las fases tempranas y con patrones de expresión muy similares en ambos genes ya que son redundantes, en esta tesis los genes CphsfA1a y CphsfA1b tuvieron un patrón de expresión muy similar entre ellos tanto en hoja como en tallo. En hoja se notó un aumento de expresión particularmente a 50 °C, mientras que en tallo los aumentos para ambos genes fueron a 40 °C y 50 °C, sin embargo no se encontró un patrón de expresión similar entre CphsfA1a y CphsfA1b en peciolo y raíz, es decir en peciolo CphsfA1a presentó un aumento de temperatura a 30 °C en relación a la temperatura control (25 °C) y dicho aumento se mantuvo a 40 °C y 50 °C mientras que los niveles de expresión del gen CphsfA1b disminuyeron conforme aumentó la temperatura en dicho tejido. En raíz el gen CphsfA1a presentó una disminución en sus niveles de expresión a 30 °C y 50 °C mientras que el gen CphsfA1b presentó una disminución a 40 °C pero un incremento a 50 °C en comparación a la temperatura control. Los 2 genes presentaron expresión en todas las temperaturas y tejidos evaluados, lo que coincide con lo encontrado en Arabidopsis, es decir son constitutivos.

Es de llamar la atención que en tomate *L. peruvianum*, el gen LphsfA1a es el regulador maestro en la respuesta al estrés térmico, a través del factor de transcripción para el cual codifica, activa la expresión de los genes LphsfA2 y LphsfA1b cuyos factores de transcripción parecen cooperar en modular la expresión génica para mantener la termotolerancia, de hecho el factor de transcripción LpHsfA1a es requerido para que el factor LpHsfA2 sea transportado hacia el núcleo. En tomate *L. esculentum* cv. MoneyMaker (hoy reclasificado como *Solanum lycopersicum*) quedó demostrado que el gen LshsfA1a al sobre expresarlo (10 veces) las plantas incrementaron su tolerancia en comparación con las plantas wild type, mientras que la supresión resultó en sensibilidad al calor, así su respectivo factor de transcripción LsHsfA1a presumiblemente funciona como regulador maestro de la respuesta a estrés térmico en *L. sculentum* al ser homólogo de LpHsfA1a en *L. peruvianum* (Mishra *et al.*, 2002) mientras que el homólogo LshsfA2 es el

gen que se expresa con más fuerza y el que produce la proteína más estable posterior a la inducción del estrés térmico, sin embargo LshsfA2 necesita de LshsfA1a para ser activado (Schramm *et al.*, 2006).

También en soya (*Glycine max*) el factor de transcripción GmhsfA1a presentó una gran actividad reguladora de otros genes (como Gmhsp70) y una gran similitud con LsHsfA1en tomate, pero sin ser demostrado aún que sea un regulador maestro. Zhu, *et al.*, (2006) mostraron mediante un análisis en tiempo real (RT-PCR) que la expresión del gen GmhsfA1a fue constitutiva en varios tejidos (hojas, hipocotilo y raíz) en plantas de soya, de 3 semanas de edad, las cuales fueron crecidas bajo condiciones normales de cultivo a 25 °C (grupo control) y la temperatura estresante consistió en una temperatura de 42 °C por 3 h, 6 h, 9 h y 18 h. Aparte del estrés térmico también se notó su respuesta a salinidad y fitohormonas.

Interesantemente en *Arabidopsis* hasta ahora no se ha identificado un regulador maestro en la respuesta al estrés térmico, los factores de transcripción tempranos AtHsfA1a y AtHsfA1b, sólo cooperan en el estrés térmico resultando en una fuerte y rápida expresión de un subgrupo de genes hsp's y hsf's. La expresión del gen AthsfA2 considerado tardío en *Arabidopsis* no es controlada por los factores de transcripción AtHsfA1a o AtHsfA1b (Busch *et al.*, 2005) y su modo de activación en *Arabidopsis* aún es desconocido. Por el momento en esta tesis no existen las pruebas suficientes para afirmar la existencia de un gen maestro y su respectivo factor de transcripción en *C. papaya* L. cv. Maradol, para ello se necesitarían más estudios para probar la existencia y en su caso determinar cuál es, ya que al menos en esta tesis se encontraron por caracterización *in silico* 18 genes Cphsfs y sus respectivos factores de transcripción Hsfs en el genoma de *C. papaya* L. cv. Maradol. Típicamente los estudios para corroborar la existencia de un gen maestro involucran el silenciamiento de genes para comprobar el papel de regulador maestro de algún gen en particular, el cual no fue el objetivo de esta tesis.

La formación del trímero llamado "complejo principal Hsf tardío" de unión al ADN que sustituye al complejo formado por los factores tempranos AtHsfA1a y AtHsfA1b, requiere del factor AthsfA2, sugiriendo que la expresión del gen AthsfA2 es dominante en la fase tardía de la respuesta al estrés térmico (Wunderlich *et al.*, 2007).

Sorprendentemente, en *Arabidopsis* la activación del gen *AthsfA2* es independiente de *AthsfA1a*, aunque la mutación en alguno de los dos, la vuelve extremadamente susceptible a calor. En plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron *AthsfA2* se mostró mayor resistencia a la combinación de estrés tanto por luz como por temperatura (Hewezi *et al.*, 2008). *AthsfA2* también juega un papel importante en la regulación transcripcional de genes *hsps* durante estrés térmico prolongado y es necesario para la termotolerancia (Charng *et al.*, 2007; Baniwal *et al.*, 2004).

Con la finalidad de estudiar la expresión de *AthsfA2* en *Arabidopsis* Charng, *et al.*, (2007) utilizaron plántulas de 3 días de edad y las expusieron a una temperatura de 37 °C durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 8 h, interesantemente en las plantas control (24 °C) no hubo expresión de los genes *AthsfA2* ni de *hsp101*, ésta se pudo observar a partir de los 15 min y se mantuvo igual hasta las 2 h, pero con una ligera disminución a las 4 h y 8 h, sin embargo cuando se evaluaron distintos tiempos de recuperación es decir 2 h, 4 h, 24 h o 48 h después de regresarlas a 24 °C se pudo observar expresión a las 2 h pero a partir de 4 h la expresión empezó a disminuir, a las 24 h la expresión fue apenas perceptible y a las 48 h contundentemente no hubo expresión muy parecido sucedió con el gen *hsp101* con la diferencia que la expresión empezó a ser poco perceptible desde las 4 h. Con ello se concluyó que *AthsfA2* en hoja de *Arabidopsis* es inducible y su expresión se puede observar aún en la fase tardía pero en las fases posteriores del estrés (recuperación) su expresión disminuye hasta el punto de no haber.

Lo que concuerda con Schramm (*et al.*, 2006) quienes concluyeron que el gen *AthsfA2* llega a ser rápidamente inactivado durante la recuperación y bajo estas circunstancias su respectivo factor de transcripción podría ser retenido en el citoplasma en complejos con proteínas *Hsps* tal y como ha sido mostrado en tomate para *LpHsfA2* (Port *et al.*, 2004) así como la interacción entre *AtHsfA2* con *AtHsfA1a/1b* en el citoplasma. El factor de transcripción *AtHsfA2* más que una proteína estable, una vez acumulada tiene un efecto creciente como activador transcripcional en los transcritos de sus genes putativos blanco en la fase de recuperación (Li *et al.*, 2010a).

En contraste, en esta tesis el gen CphsfA2 presentó expresión en todos los tejidos evaluados cuando la exposición fue de 1 h, su expresión fue uniforme en hoja, peciolo y tallo mientras que en raíz aumentó la expresión conforme aumentó la temperatura y más interesante fue el hecho de encontrar expresión del gen CphsfA2 en etapas posteriores al estrés. En hoja y peciolo la expresión fue muy similar tanto en el punto estresante como a 1 semana de recuperación, mientras que en tallo y raíz la expresión fue mayor en el punto estresante que en la etapa de recuperación.

Los términos temprano y tardío, se han usado principalmente en Arabidopsis durante la etapa del estrés, Wunderlich, *et al.*, (2007) mencionan que los genes hsf tempranos actúan en la fase temprana expresándose de manera constitutiva en la célula, mientras que los genes hsf tardíos son aquellos cuya expresión aparece (genes inducibles) y/o va aumentando significativamente bajo estrés (constitutivos), lo que sugiere que éstos podrían requerir la acción de factores de transcripción hsf tempranos para su activación. En Arabidopsis los factores de transcripción Hsf tardíos contribuyen poco a la expresión temprana inicial de genes de estrés térmico y también es posible observar una transición desde la fase temprana hacia una tardía, marcada por cambio en la capacidad de unión al ADN de los factores Hsf (Lohmann *et al.*, 2004) y la expresión masiva (inducida por calor) de Hsp y otros Hsf.

Típicamente los estudios moleculares acerca de la respuesta por estrés térmico tanto en animales como en plantas se han centrado en evaluar la expresión de genes hsf en condiciones estresantes pero aún faltan estudios moleculares que evalúen lo que ocurre en etapas posteriores al estrés es decir en la etapa de recuperación (post-estrés). Otro trabajo además de Chang, *et al.*, (2007) sobre recuperación, es el realizado por Xin, *et al.*, (2010) quienes concluyeron que el gen LlhfA2 es inducible en plantas de Lily (*Lilium longiflorum cv white heaven*) las plantas tuvieron una edad de 30 días y se expusieron durante 1 h a 37 °C, la temperatura control fue de 22 °C. Los tejidos evaluados fueron hojas, bulbos y raíces; en estos 3 tejidos no se encontró expresión en la temperatura control (22 °C) pero si a 37 °C, interesantemente cuando se evaluó la expresión en hojas de Lily con distinto tiempo en estado recuperación (exposición durante 1 h a 37 °C y regresadas a 22 °C), por ejemplo a las 2 h de recuperación se mantuvo el mismo nivel que el observado al término de la exposición pero a las 4 h y 8 h de recuperación los

niveles de expresión disminuyeron, lo que indicó que al menos en esta especie el gen *LlhsfA2* es inducible en los tres tejidos evaluados y su expresión disminuyó en etapas de recuperación, similar a lo encontrado en *Arabidopsis* por Chang, *et al.*, (2007). Con la finalidad de verificar si el gen *LlhsfA2* presentaba algún cambio de expresión a temperaturas mayores, en hoja (únicamente) se evaluó un aumento de 10 °C, es decir una temperatura estresante de 47 °C durante 1 h pero no hubo expresión como en el caso de la temperatura control. Este resultado de igual forma contrasta con lo encontrado en esta tesis donde el gen *CphsfA2*, presentó expresión de manera constitutiva tanto en etapas de estrés moderado, durante el punto de estrés térmico y en la etapa de recuperación. Vale la pena mencionar que Lily es una planta con importancia en el mercado de flores, que normalmente crece a temperaturas entre 18 °C y 22 °C, es decir temperaturas templadas como en el caso de *Arabidopsis* en comparación con *C. papaya* L. cv. Maradol, lo que podría sugerir que la expresión de dicho gen evaluado es de suma importancia para papaya.

IV.4.2 Clase B

En la literatura es mayor el número de trabajos realizados sobre los genes *hsfs* de la clase A, es de suponer que se debe en gran medida a que dichos genes a través de sus respectivos factores de transcripción son activadores de genes involucrados en la respuesta al estrés térmico como los genes *hsps* y más interesante es el hecho que los genes *hsfs* de la clase A se pueden activar a sí mismos mientras que los genes *hsfs* de la clase B parecen estar involucrados en funciones de coactivación y supresión. Los factores de transcripción *Hsfs* de la clase B, difieren de la clase A por una variación estructural dentro de los dominios de oligomerización y de unión al ADN y la falta de un motivo AHA que se requiere para la función de la activación transcripcional de los *hsfs* clase A, suponiendo así que los genes *hsfs* de la clase B no se pueden auto-activar y requieren primero de la activación de los genes *hsfs* de la clase A (Koskull-Döing *et al.*, 2007).

En el genoma de *Arabidopsis* solo hay cinco genes *hsfs* diferentes de la clase B, dos de los cuales son considerados con funciones tempranas (*AthsfB3* y *AthsfB4*) y los otros tres son considerados que actúan como *hsfs* tardíos (*AthsfB1*, *HsfB2a*, *HsfB2b*) porque su expresión de ARNm se incrementa significativamente en el estrés térmico y hay pruebas

de que esta expresión inducida por el calor requiere la acción combinada de los hsf's tempranos de la clase A: AthsfA1a y AthsfA1b (Schramm *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004). Se podría esperar en esta tesis que CphsfB1 y CphsfB2b tuvieran una actividad tardía, es decir una mayor expresión conforme aumenta el tiempo de exposición, en *C. papaya* L. cv. Maradol ambos genes presentaron expresión en todos los tejidos y en todas las temperaturas, aún en condiciones no estresantes como en la temperatura control 25 °C.

El único trabajo realizado en papaya acerca de los genes hsf's fue el de Tarora, *et al.*, (2010) quienes clonaron un gen hsf en *Carica papaya* L. cv. Fruit tower (cultivo Taiwanés) al que designaron CphsfB1, él y sus colaboradores realizaron el estudio en raíces emergentes (radículas) de semillas germinadas a 26 °C y tomaron una hoja joven (no se menciona el estrato de donde se tomó) de una planta adulta (no mencionan la edad) la cual se incubó previamente a 26 °C. Con la finalidad de evaluar el estrés expusieron tanto radículas como hojas a una temperatura de 42°C durante 30 min, la temperatura control en ambos tejidos fue 26°C. Concluyeron por análisis de Northern blot que CphsfB1 es constitutivo en radícula e inducible en hoja, es decir en hoja no se encontró expresión a 26 °C, pero si a 42 °C, también sugirieron que el gen CphsfB1 pudiera estar involucrado en germinación y por análisis bioinformático determinaron que es un homólogo de LphsfB1 en tomate *L. peruvianum* (*Solanum peruvianum*).

Los resultados de Tarora (*et al.*, 2010) no incluyeron estudios de etapas con mayor duración a 42 °C (por ejemplo 1 h o 2 h) y posteriores al estrés (recuperación), pero al menos en raíz, el resultado es concordante con lo encontrado en esta tesis en *C. papaya* cv Maradol cuando las exposiciones térmicas fueron de 1 h, es decir la expresión de raíz fue constitutiva al encontrarse en todas las temperaturas evaluadas de 30 °C, 40 °C y 50 °C, sin embargo en hoja el resultado fue contrastante, pues en esta tesis su expresión fue constitutiva en las plantas con una edad de 70 días, aunque Tarora (*et al.*, 2010) utilizaron plantas adultas aún así contrasta con lo encontrado en esta tesis, ya que también se encontró expresión en las plantas adultas del estudio de expresión basal. Interesantemente en peciolo y tallo la expresión se encontró en todas las temperaturas, hubo un aumento a partir de 40 °C. En el caso del gen CphsfB2b su expresión tuvo un aumento en particular a los 40 °C en todos los tejidos evaluados.

Los factores de transcripción hsfs de la clase B al igual que los de la clase A, tienen la capacidad de unirse a sitios similares o los mismos, en los promotores de genes de choque térmico, se propuso que ellos puede actuar como co-activadores o represores de la expresión de genes diana. En tomate el factor de transcripción LsHsfB1 actúa como coactivador de la transcripción mientras que en Arabidopsis AtHsfB1 es un represor transcripcional (Czarnecka-Verner *et al.*, 2004; Bharti *et al.*, 2004; Czarnecka-Verner *et al.*, 2000). En Arabidopsis, el gen AthsfB1 es el más fuertemente inducido por calor de los Hsfs clase B (Busch *et al.*, 2005), su sobreexpresión transgénica no tuvo ningún efecto sobre la expresión de proteínas de choque térmico (Hsps) o el desarrollo de termotolerancia, pudiera estar implicado en otros aspectos de la planta como crecimiento.

En Arabidopsis es común que los estudios del efecto del estrés térmico acerca de la expresión de genes sea evaluado después de 1 h debido a que se sabe por Lohmann (*et al.*, 2004) que los niveles de ARNm de genes relacionados con el estrés térmico (como hsps y hsfs) muestran un máximo después de 1 h del estrés térmico para luego decrecer. Así por ejemplo Kumar, *et al.*, (2009) evaluaron el estrés térmico en Arabidopsis, la expresión fue evaluada mediante niveles de transcrito por RT-qPCR en un solo tejido (hoja) las plantas tuvieron una edad de 5-6 semanas, la temperatura control fue 22 °C y la temperatura estresante consistió de 37 °C durante 1 h, se usaron plantas wild type y plantas con una sola mutación ya sea con el gen AthsfB1 mutado o AthsfB2b mutado. Se encontró que a 22 °C las plantas wild type expresaron bajos niveles comparado con el gen control (Actina=100%) sólo un 15 % para AthsfB1 y un 4 % para AthsfB2b. Después del estrés térmico los niveles de AthsfB1 incrementaron en la planta wild type así como en la planta con la mutación en AthsfB2b, 12 y 30 veces respectivamente, y como era de esperarse no se encontró niveles de transcrito de AthsfB1 en plantas con el gen AthsfB1 mutado en las plantas mantenidas en la temperatura control ni después del estrés térmico. Por otra parte los niveles de ARNm del gen AthsfB2b fueron sobre regulados (alta expresión) en plantas wild type y en las plantas con el gen AthsfB1 mutado, por factores de 3 a 5 veces después del estrés térmico pero los transcritos de AthsfB2b no fueron detectados en plantas con el gen AthsfB2b mutado tanto en la temperatura control como en el estrés térmico.

Debido a que fenotípicamente no hubieron cambios entre las plantas de *Arabidopsis wild type* y las plantas con una sola mutación en alguno de los 2 genes evaluados, se realizó un nuevo experimento en plantas con doble mutación *AthsfB1-AthsfB2b*, con exposiciones de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h y 8 h, los niveles de ARNm de *AthsfB1* y *AthsfB2b* tuvieron muy poco nivel de expresión comparado con actina (20 y 0.2%, respectivamente) en plantas *wild type* a 22 °C. Sin embargo los niveles de expresión tuvieron un gran aumento después del estrés en el caso del gen *AthsfB1* (de 20 % incrementó hasta 275 % respecto de Actina), y en el gen *AthsfB2b* aunque hubo incremento, éste fue muy poco (de 0.2 % a 3.5%), en ambos casos el incremento se dio a 1 h y disminuyó a partir de 2 h del estrés térmico, a las 8 h la expresión del gen *AthsfB1* descendió de 275 % hasta 150 % y el gen *AthsfB2b* de 3.5 % hasta 1 %. En las plantas con la doble mutación no se detectaron los niveles de expresión para ninguno de los genes, ni en la temperatura control ni en el estrés térmico. Con ello se concluyó que en hojas de plantas de *Arabidopsis* expuestas a 37 °C estos genes son constitutivos y se encuentran presentes aún en etapas prolongadas de estrés (8 h), aunque el gen *AthsfB2b* en sentido estricto se clasifica como constitutivo en muy bajo nivel. Interesantemente en esta tesis en *C. papaya* L. cv. Maradol los 2 genes se encontraron de manera constitutiva en los distintos tiempos y temperaturas de exposición.

En el lapso de tiempo de 1 a 8 h también se evaluaron los niveles de ARNm de los genes *hsp17.6*, *hsp23.6*, *hsp70*, *hsp83.1* y *hsp101*, los mayores picos se dieron a las 2 h con una disminución marcada a partir de 4 h y muy poca a las 8 h tanto en plantas *wild type* como en las plantas con doble mutación en relación a las plantas mantenidas a temperatura control quedando demostrado que estos 2 genes de la clase B no tienen un papel importante en la regulación de los genes *hsp*s regulados por la clase A, como lo tienen *AthsfA1a* y *AthsfA1b* evaluados por Lohmann (*et al.*, 2004), esto también fue encontrado en tomate cuando se suprimió el gen *LphsfB1*, las plantas no mostraron un fenotipo afectado (Mishra *et al.*, 2002) existe evidencia en tomate que el gen *LphsfB1* (ortólogo de *AthsfB1*) puede interactuar a través de su factor de transcripción *LpHsfB1* con *LpHsfA1* en funciones de co-activación (Bharti *et al.*, 2004). Lo mismo se ha visto en *Arabidopsis* con el factor transcripcional *AtHsfB1* que puede interactuar con *AtHsfA2* para ejercer un papel negativo (represión) de la expresión.

IV.4.3 Clase C

Los genes *hsfs* y factores de transcripción de la clase C, han sido menos estudiados, se sugiere podría ser por carecer hasta el momento de una función específica, esto en comparación a la clase A que tienen funciones de activadores, pero se sugiere están involucrados, como el caso de la clase B, como coactivadores y represores (de la clase A). Uno de los pocos estudios donde se incluye esta clase fue el realizado por Wang, *et al.*, (2009) quienes utilizaron los brotes de hojas (shoots) de plantas de arroz (*Oryza japonica*) con una edad de 7 días, en esta planta por estudios bioinformáticos se encontraron 25 genes *hsfs* y sus respectivas proteínas *Hsfs*: 13 correspondieron a la clase A, 8 a la clase B y 4 a la clase C, en este último caso fueron *OjhsfC1a*, *OjhsfC1b*, *OjhsfC2a* y *OjhsfC2b*. Este estudio no fue exclusivo para la clase C, ya que se evaluó la expresión de 19 genes, para ello las plantas fueron sometidas a una temperatura de 37 °C durante 1 h, 6 h y 24 h, la temperatura control fue 25 °C, no se incluyeron estudios en etapas de recuperación. De los 4 genes *hsfs* de la clase C sólo se evaluó la expresión de 2, *OjhsfC1b* y *OjhsfC2a*, en el caso del gen *OjhsfC1b* sólo hubo expresión a las 6 h (inducible) mientras que *OjhsfC2a* mostró el mismo nivel de expresión en los tiempos evaluados (constitutivo).

En la presente tesis cuando se evaluó la expresión basal en *C. papaya* L. cv. Maradol del único gen *hsf* de la clase C, denominado *CphsfC1*, se observó expresión en todos los tejidos evaluados aunque menor en fruto inmaduro y maduro. También cuando se valuó la exposición a diferentes temperaturas durante 1 h, se encontró expresión en todas las temperaturas evaluadas con un aumento de expresión particularmente a 40 °C en todos los tejidos evaluados, sin embargo cuando se evaluó la expresión durante el estrés y posterior al mismo (recuperación) resultó interesante en hoja y tallo, donde el gen *CphsfC1* presentó mayor expresión en la temperatura control (25 °C) y después del estrés (recuperación), mientras que en peciolo su expresión fue constante y en raíz la expresión fue similar antes y durante el estrés, pero disminuyó en la etapa de recuperación. Por el momento la información sobre esta clase es poca y vale la pena resaltar que en *C. papaya* L. el presente trabajo constituye el primer reporte sobre este gen, el cual fue constitutivo.

IV.5 CONCLUSIONES

IV.5.1 Expresión basal de genes tipo Cphsfs

Cuando se realizó el estudio de expresión basal en plantas adultas de *Carica papaya* L. cv. Maradol (figura IV.2) los 6 genes evaluados, CphsfA1a, CphsfA1b, CphsfA2, CphsfB1, CphsfB2b y CphsfC1 presentaron expresión en los 7 tejidos evaluados: hoja, peciolo, pétalo, fruto inmaduro, fruto maduro, tallo y raíz. Los genes CphsfA1a, CphsfA2 y CphsfB2b presentaron una mayor expresión basal en todos los tejidos evaluados en comparación con los genes CphsfA1b y CphsfB1, los cuales presentaron la menor expresión basal; sin embargo en estos últimos se observó un incremento de expresión en fruto inmaduro, sugiriendo su posible papel en el desarrollo del fruto. El gen CphsfC1 presentó una expresión basal bastante uniforme en los diferentes tejidos, excepto en fruto inmaduro y maduro, donde la expresión basal disminuyó.

IV.5.2 Expresión de genes tipo Cphsfs en respuesta a calor

En el experimento de exposición de temperaturas de 30 °C, 40 °C y 50 °C con exposición de 1 h y sin regresar a 25 °C (estrés moderado) se encontró expresión en todos los tejidos evaluados, incluyendo la temperatura control de 25 °C.

En hoja, el gen con niveles altos de expresión en todas las temperaturas evaluadas fue CphsfA2 además su expresión se mantuvo estable. En el gen CphsfA1a los niveles de expresión aumentaron al ser expuestos a temperaturas más elevadas en comparación a la expresión observada a 25 °C, lo que lo hace un buen candidato para estudios posteriores de calor ya que parece responder de manera proporcional al aumento de temperatura. En relación a 25 °C los genes CphsfA1b, CphsfB1, CphsfB2b y CphsfC1, presentaron disminución de expresión en las temperaturas de 30 °C y 40 °C pero con un aumento a 50 °C.

En peciolo el gen con los mayores niveles de expresión en todas las temperaturas evaluadas fue CphsfA1a su expresión aumentó conforme incrementó la temperatura en comparación con la expresión a 25 °C, lo contrario sucedió con el gen CphsfA1b con una

disminución en su expresión en relación a 25 °C. El gen CphsfA2 aparentemente mantuvo una expresión uniforme conforme aumentó la temperatura, mientras que los genes CphsfB1, CphsfB2b y CphsfC1 tuvieron un ligero aumento sólo a 40 °C.

En tallo el gen con los mayores niveles de expresión en las temperaturas evaluadas fue CphsfA2 y presentó una expresión uniforme en éstas. Los genes CphsfA1a y CphsfA1b presentaron un incremento en la expresión conforme aumentó la temperatura en y parecen ser los que mejor responden al aumento de temperatura en este tejido. En cambio CphsfB1 aparentemente tuvo una disminución en el nivel de expresión a 30 °C y un incremento a 40 °C. Los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron los menores niveles de expresión a 30 °C y 50 °C y un incremento a 40 °C.

En raíz los genes CphsfA1a y CphsfB2b presentaron disminución en la expresión a 30 °C y 50 °C, comparado con 25 °C, mientras que a 40 °C ésta fue similar a la observada a 25 °C. En el gen CphsfA1b la expresión aparentemente disminuyó a 40 °C mientras que en el gen CphsfA2 disminuyó a 30 °C pero con un aumento a 40 °C y 50 °C. Interesantemente CphsfB1 presentó una expresión uniforme aun cuando aumentó la temperatura. En el gen CphsfC1 aumentó la expresión a 40 °C mientras que a 30 °C y 50 °C el nivel de expresión fue similar a 25 °C.

En el capítulo del análisis fisiológico se determinó como punto estresante justo a las 4 h en estado de recuperación a 25 °C después de una exposición de 4 h a 50 °C, (4 h de exposición a 50 °C + 4 h a 25 °C) por ello se eligió este punto para evaluar el estrés térmico severo mientras que la etapa post estrés (recuperación) se evaluó después de 1 semana (4 h de exposición a 50 °C + 1 semana a 25 °C).

En hoja los genes CphsfA1a, CphsfB2b y CphsfC1, presentaron una mayor expresión a 1 semana de recuperación sin embargo en el gen CphsfA1a la expresión a las 4 h de recuperación fue similar a la observada a 25 °C. Los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron una ligera disminución en la expresión a las 4 h de recuperación en comparación a 25 °C, estos resultados sugieren que en hoja CphsfA1a, CphsfB2b y CphsfC1 están involucrados en etapas posteriores del estrés y más interesante es que CphsfA1a está presente en la etapa del estrés térmico con un aumento en la etapa del

post estrés mientras que CphsfB2b y CphsfC1 parecen tener menor participación en la etapa del estrés térmico. El gen CphsfA2 presentó un aumento de expresión en el punto estresante (4 h de recuperación) y a 1 semana de recuperación, en comparación con la observada a 25 °C, a mientras que en CphsfA1b la expresión disminuyó a 4 h y 1 semana, de recuperación respectivamente. El gen CphsfB1, presentó un aumento en su expresión a las 4 h de recuperación pero una disminución a 1 semana de recuperación. Esto sugiere que CphsfA2 pudiera estar involucrado en hoja tanto en la etapa del estrés térmico como en la etapa de recuperación. La disminución de la expresión en las dos etapas evaluadas del gen CphsfA1b sugiere la posibilidad de que dicho gen no actué de manera importante en etapas del estrés, mientras que CphsfB1 actuó en la etapa del estrés térmico pero no en la etapa de recuperación.

En peciolo el gen CphsfA1a presentó un aumento en la expresión a 1 semana de recuperación en comparación a 25 °C, mientras que a 4 h de recuperación el nivel fue similar a lo encontrado a 25 °C. En el gen CphsfA1b, el aumento de expresión fue mayor a 1 semana de recuperación mientras que el gen CphsfA2 se observó un aumento en su expresión a las 4 h de recuperación y este nivel fue similar a 1 semana de recuperación. El gen CphsfB1 presentó un aumento de expresión a las 4 h de recuperación y luego disminuyó a 1 semana de recuperación a un nivel similar que a 25 °C.

Los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron el mismo nivel de expresión a 4 h y 1 semana de recuperación en comparación con 25 °C. En peciolo los genes CphsfA1a y CphsfA1b parecen estar involucrados en la etapa del estrés térmico pero es mayor su papel en la respuesta del post-estrés mientras que el gen CphsfA2 parece estar involucrado por igual tanto en la etapa del estrés térmico como en el post-estrés. Interesantemente el gen CphsfB1 se encontró con mayor nivel de expresión en la etapa del estrés térmico mientras que los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron el mismo nivel de expresión a 25 °C, a 4 h y 1 semana de recuperación sugiriendo poca participación en las dos etapas evaluadas.

En tallo los genes CphsfA1a y CphsfB1, presentaron un aumento de expresión a las 4 h y 1 semana de recuperación en relación a 25 °C, pero similar entre las dos etapas evaluadas. Al contrario sucedió en el gen CphsfA1b, su expresión disminuyó a 4 h y 1

semana de recuperación en comparación con 25 °C. Los genes CphsfA2 y CphsfB2b presentaron un ligero aumento de expresión a 4 h de recuperación pero una disminución a 1 semana de recuperación en comparación a 25 °C, mientras que el gen CphsfC1 presentó una disminución de la expresión a las 4 h de recuperación en comparación con 25 °C y un nivel de expresión similar a 1 semana de recuperación a lo observado a 25 °C.

En tallo los genes CphsfA1a y CphsfB1 parecen actuar por igual en la etapa del estrés térmico como del post estrés mientras que el gen CphsfA1b no parece tener un papel fundamental en dichas etapas. Los genes CphsfA2 y CphsfB2b parecen actuar mayormente en la etapa del estrés térmico mientras que el gen CphsfC1 parece actuar menos en esta etapa.

En raíz el gen CphsfA1a mantuvo una expresión muy similar tanto a 25 °C como a 4 h y 1 semana de recuperación respectivamente mientras que en los genes CphsfA1b y CphsfB1 los niveles de expresión fueron similares tanto a 25 °C como a las 4 h de recuperación pero se encontró una disminución a 1 semana de recuperación. El gen CphsfA2 presentó un aumento en su expresión a las 4 h de recuperación en relación a la a 25 °C y un nivel similar a 25 °C cuando se evaluó 1 semana de recuperación. En cambio los genes CphsfB2b y CphsfC1 presentaron disminución en la expresión en relación a 25 °C, más evidente en CphsfC1 a 1 semana de recuperación.

Estos resultados sugieren que el gen CphsfA1a no participa de manera contundente en etapas del estrés ya que su expresión fue similar aún en condiciones no estresantes como 25 °C mientras que los genes CphsfA1b y CphsfB1 parecen actuar menos en la etapa del post estrés en relación a la etapa del estrés térmico. El gen CphsfA2 parece responder mayormente en la etapa del estrés térmico y sorprendentemente los genes CphsfB2b y CphsfC1 parecen tener una menor contribución a la respuesta del choque térmico tanto en la etapa del estrés térmico como en la etapa del pos-estrés.

IV.6 REFERENCIAS

- Agashe, V.R. y F.U. Hartl (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 11, 15–25.
- Akerfelt, M., Trouillet, D., V. Mezger y L. Sistonen (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1113, 15–27.
- Baniwal, S. K; Bharti, K; Chan, K. Y; Fauth, M; Ganguli, A; Kotak, S; Mishra, S. K; Nover, L; Port, M; Scharf, K. D; Tripp, J; Weber, C; D. Zielinski y P. von Koskull-Döring (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*, 29, 471–487.
- Bharti, K., von Koskull-Döring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschl-Körbitzer, A., E. Treuter y L. Nover (2004). Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfB1 Represents a Novel Type of General Transcription Coactivator with a Histone-Like Motif Interacting with the Plant CREB Binding Protein Ortholog HAC1. *The Plant Cell*, 16, 1521–1535.
- Busch, W., M. Wunderlich y F. Schöffl (2005). Identification of novel heat shock factor dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 41, 1–14.
- Chan-Schamimet, KY; Baniwal, SK; Bublak, D; L. Nover y K-D. Scharf (2009) Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression. *J Biol Chem*, 284, 20848-20857.
- Chang, Y. Y., Liu, H. C., Liu, N. Y., Chi, W. T., Wang, C. N., S. H. Chang y T. T. Wang (2007). A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 251–262.
- Christians, E., Davis, A. A., S. D. Thomas y I. J. Benjamin (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature*, 407, 693–694.
- Czamecka-Verner, E., Pan, S., T. Salem y W. B. Gurley (2004). Plant class B Hsfs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Mol. Biol.*, 56, 57–75.
- Czamecka-Verner, E., Yuan, C. X., Scharf, K. D., G. English y W. B. Gurley (2000). Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Mol. Biol.*, 43, 459–471.
- Freitag, W., Zhang, Y., Dai, R., M. G. Anderson y N. F. Mivechi (2001) Heat shock factor-4 (HSF-4a) represses basal transcription through interaction with TFIIF. *J Biol Chem*, 276, 14685–14694.
- Fujimoto M y A Nakai (2010). The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J*, 277, 4112-25.

- Hewezi, T., M. Léger y L. Gentzbittel (2008). A Comprehensive Analysis of the Combined Effects of High Light and High Temperature Stresses on Gene Expression in Sunflower. *Annals of Botany*, 102, 127–140.
- Hsu, A. L., C. T. Murphy y C. Kenyon (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300, 1142–1145.
- Jedlicka P, Mortin MA, Wu C (1997) Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* 16:2452–2462.
- Kallio, M., Chang, Y., Manuel, M., Alastalo, T. P., Rallu, M., Gitton, Y., Pirkkala, L., Loones, M. T., Paslaru, L., Larney, S., Hiard, S., Morange, M., L. Sistonen y V. Mezger (2002). Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J*, 21, 2591–2601.
- Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., F. Bicker y P. von Koskull-Döring (2004). Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *Plant Journal*, 39(1), 98-112.
- Koskull-Döring, P., k-D. Scharf y L. Nover (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.*, 12, 452–457.
- Kumar, M., Busch, W., Birke, H., Kemmerling, B., Nürnberger, T., and F. Schöffl. 2009. Heat Shock Factors HsfB1 and HsfB2b Are Involved in the Regulation of Pdf1.2 Expression and Pathogen Resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant* Volume 2 (1) 152–165.
- Li, M., W. Berendzen y F. Schöffl (2010). Promoter specificity and interaction between early and late *Arabidopsis* heat shock factors. *Plant Mol Biol.*, 73(4-5), 559-567.
- Li, M., Doll, J., Weckermann, K., Oecking, C., K. W. Berendzen y F. Schöffl (2010). Detection in vivo of interactions between Arabidopsis class A-HSFs, using a novel BiFC fragment, and identification of novel class B-HSFs interacting proteins. *Eur J Cell Biol*, 89, 126-132.
- Liu., G-T, Jun-Fang, W., Grant, C., Zhan-Wu, D., Wei, D., Hong-Guo, X., Ben-Hong., W, Pei-Ge, F., Li-Jun, W. y L. Shao-Hua (2012). Transcriptomic analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves during and after recovery from heat stress.
- Liu, L., M. J. White y T. H. MacRae (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem*, 262, 247-257.
- Lohmann, C., Eggers-Schumacher, G., M. Wunderlich y F. Schöffl (2004). Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis. *Mol Gen Genomics*, 271, 11–21.

- Mishra, S. K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., L. Nover y K. D. Scharf (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HSFA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev*, 16, 1555–1567.
- Nakasone H. Y. y R. E. Paull (1998). Papaya, in: *Tropical fruits. Crop production science in horticulture N°7*. CAB International Publication (ed), Wallingford UK, pp. 239-269.
- Nishizawa-Yokoi, A; Yoshida, E; Yabuta, E; Shigeoka, S. (2009). Analysis of the regulation of target genes by an *Arabidopsis* heat shock transcription factor HsfA2. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:890-895.
- Nishizawa, A; Yabuta, Y; Yoshida, E; Maruta, T; Yoshimura, K; Shigeoka, S. (2006). *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J*. 48:535-547.
- Nover, L; Bharti, K; Döring, P; Mishra S. K; A. Ganguli y K. D. Scharf (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress Chaperones*, 6, 177–189.
- Parker, C. S. y J. Topol (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. *Cell*, 37, 273–283.
- Pirkkala, L., P. Nykanen y L. Sistonen (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J*, 15, 1118–1131.
- Port, M., Tripp, J., Zielinski, D., Weber, C., Heerklotz, D., Winkelhaus, S., D. Bublak y K-D. Scharf (2004). Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol*, 135, 1457–1470.
- Ritossa, F (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571–573.
- Scharf, K. D., Berberich, T., I. Ebersberger y L. Nover (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 104–119.
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., English, G., D. Walch y P. von Koskull-Döring (2006). The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 60, 759–772.
- Sorger, P. K. y H. R. Pelham (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell*, 54, 855–864.
- Sun, A., Yi, S., Yang, J., C. Zhao y J. Liu (2006). Identification and characterization of a heat-inducible ftsH gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Sci.*, 170, 551–562.

- Tarora, K., Tamaki, M., Shudo, A., Urasaki, N., H. Matsumura y S. Adaniya (2010). Cloning of a heat stress transcription factor, CphsfB1, that is constitutively expressed in radicles and is heat-inducible in the leaves of *Carica papaya*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102, 69–77.
- Tissi eres, A., H. K. Mitchell y U. M. Tracy (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J.Mol. Biol.*, 84, 389-398.
- Wang, C., Q. Zhang y H-X. Shou (2009). Identification and expression analysis of OsHsfs in rice. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10,4, 291-300.
- Weng, J. H. y M. F. Lai (2005). Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. *Photosynthetica*, 43(3), 433-444.
- Wiederrecht, G., D. Seto y C. S. Parker (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell*, 54, 841–853.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 441–469.
- Wu, C. (1984). Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature*, 311, 81–84.
- Wunderlich, M., Doll, J., Busch, W., Kleindt, C. K., C. Lohmann y F. Sch offl (2007). Heat Shock Factors: regulators of early and late functions in plants stress response. *Plant Stress*, 1, 16-22.
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A. A., McMillan, D. R., Curry, B. B., J. A. Richardson y I. J. Benjamin (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*, 18, 5943–5952.
- Xin, H., Zhang, H., Chen, L., Li, X., Lian, Q., Yuan, X., Hu, X., Cao, L., X. He y M. Yi (2010). Cloning and characterization of HsfA2 from Lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Rep*, 29, 875–885.
- Zhu, B., Ye, C., L u, H., Chen, X., Chai, G., J. Chen y C. Wang (2006). Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, GmHsfA1, in soybeans (*Glycine max*). *J Plant Res*, 119:247–256.

CAPITULO V

V.1. DISCUSIÓN GENERAL

V.1.1 Análisis bioinformático y elección de genes *hsfs* para el estudio de su expresión

Carica papaya L. cv. Maradol es un frutal de gran importancia económica en la agricultura mundial, en especial en zonas tropicales y subtropicales, sin embargo son escasos los estudios acerca del efecto por altas temperaturas que incluyan aspectos bioinformáticos, fisiológicos y moleculares, es por ello que en la presente tesis se llevó a cabo un estudio que incluyera estos 3 aspectos, es decir un enfoque integral que se pueda convertir en un marco de referencia para estudios posteriores, incluso en adición a estrés hídrico y lumínico ya que las condiciones agrícolas en zonas tropicales donde se cultiva *C. papaya* L. cv. Maradol como el Estado de Yucatán, suelen estar caracterizadas por altas temperaturas, poca disponibilidad del agua (humedad) tanto en aire como en el suelo así como una alta radiación solar. Es decir el fenómeno es complejo y esta tesis representa un primer esfuerzo en entender las afectaciones por las temperaturas elevadas, que caracterizan al Estado de Yucatán y al sureste mexicano en general, sobre esta especie ampliamente cultivada en México.

La atenuación de las afectaciones por temperaturas elevadas está relacionado a la respuesta del choque térmico, donde los genes del choque térmico llamados genes heat shock transcription factors (genes *hsfs*) parecen regular tal respuesta. Partiendo del conocimiento en *A. thaliana* sobre los genes *hsfs* se sabe que están conservados en varias especies estudiadas hasta hoy y codifican para unas proteínas del mismo nombre llamadas proteínas *Hsfs*, las cuales actúan como factores de transcripción siendo así el componente terminal de una cascada de señales de transducción en Eucariotes al regular la expresión de genes involucrados en el choque térmico. Típicamente estos genes son los genes heat shock proteins que codifican para chaperonas moleculares confiriendo una mejor tolerancia al estrés térmico (Hewezi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 1999).

Para estudiar el estrés térmico por incremento de temperatura así como el tiempo de exposición en *C. papaya* L. cv. Maradol se aislaron *in silico* las secuencias nucleotídicas hsfs homólogas a *A. thaliana* dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp a partir de las 21 secuencias nucleotídicas codificantes hsfs. Estas 21 secuencias en *A. thaliana* correspondieron a las reportadas en los trabajos pioneros en el estudio de la respuesta del choque térmico en *Arabidopsis thaliana* de Nover, *et al.*, (2001), Nover y Scharf (1997), Nover (1991), Nover, *et al.*, (1989b) y Nover, *et al.*, (1989a).

En *A. thaliana* la familia heat shock factors se conforma de 21 genes hsfs y se encuentra dividida en 3 clases: A (15), B (5) y C (1), de acuerdo a las características en los dominios de las proteínas Hsfs. Las proteínas Hsfs o factores transcripcionales Hsfs de la clase B y de la clase C, difieren de la clase A por su capacidad de activación transcripcional suponiendo así que los genes hsfs de la clase B y C no se pueden auto activar a través de sus factores de transcripción Hsfs y requieren primero de la expresión de los genes hsfs de la clase A para que codifiquen las respectivas proteínas Hsfs de la clase A. Se sugiere la función como represores y coactivadores de la clase B y C (Koskull-Döring *et al.*, 2007; Nover *et al.*, 2001; Nover y Scharf, 1997; Nover *et al.*, 1996).

Se encontraron 18 secuencias nucleotídicas homólogas hsfs dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp, respaldadas por porcentajes de identidad entre 62 % y 93 % y de similitud entre el 75 % y 100 % así como valores esperados entre $E = 10^{-28}$ y $E = 10^{-155}$. La presencia de secuencias hsfs en *C. papaya* L. cv. SunUp es una evidencia más de su existencia conservada entre diversas especies estudiadas (Akerfelt *et al.*, 2007) como en tomate (Chan-Schaminet *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2002) soya (Zhu, *et al.*, 2006), arroz (Wang, *et al.*, (2009) maíz (Lin *et al.*, 2011) y aunque, en estos casos corresponden a plantas con uso alimenticio interesantemente también se han reportado en Lily (Xin, *et al.*, 2010) una planta con importancia en el mercado de flores.

El menor número de secuencias nucleotídicas hsfs homólogas dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp (18) en relación a *A. thaliana* (21) es consistente con la reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20% que presenta *C. papaya* L. en comparación con *A. thaliana* según lo reportado por Ming *et al.*, 2008. De hecho estos autores reportaron que *C. papaya* L. posee 19 homólogos hsfs en su genoma, un número

que difiere poco a lo encontrado en esta tesis. En la base de datos PInTFDB V 3.0 (2010) se encuentran registrados 18 superconting que codifican para factores de transcripción Hsfs a partir del genoma de *C. papaya* L. registrado en NCBI y se corroboró que son los mismos 18 encontrados en esta tesis.

El número de genes hsfs (igual al número de factores de transcripción Hsfs para los cuales codifican) es muy diferente entre los distintos organismos eucariotas, por ejemplo, en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), insectos (*Drosophila melanogaster*) y nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) se encuentra un único gen hsf (Hsu *et al.*, 2003; Jedlicka *et al.*, 1997; Wiederrecht *et al.*, 1988; Sorger y Pelham, 1988) mientras que en plantas es mayor el número como en *Arabidopsis* donde se conocen 21 genes hsfs, en tomate 24, en arroz 25, 30 en maíz y mediante los resultados obtenidos en esta tesis se plantea la posibilidad de la existencia de 18 genes hsfs y sus 18 proteínas Hsfs en papaya. La multiplicidad de los genes hsfs en plantas sugiere una diversidad funcional y complejidad en plantas a diferencia de los animales (Scharf *et al.*, 2012).

Las secuencias proteicas predichas CpHsfs presentaron dominios conservados en relación a las secuencias proteicas de *A. thaliana*. Los dominios mejor conservados fueron el dominio de unión al ADN (DBD), y el dominio de oligomerización (OD) lo cual es consistente con lo reportado en la literatura.

En el caso del dominio DBD también se señalaron las regiones correspondientes a las 4 láminas β antiparalelas y las 3 hélices α pertenecientes al motivo central hélice-giro-hélice (H2-T-H3) el cual es indispensable para el reconocimiento específico del ADN y es común en proteínas involucradas en regulación de expresión génica, es decir proteínas que actúan como factores de transcripción, estas características corresponden con lo descrito por Cicero (*et al.*, 2001) Littlefield y Nelson (1999), Nover y Scharf (1997), Schultheiss (*et al.*, 1996), Wu (1995), Damberger (*et al.*, 1994) Harrison (*et al.*, 1994) y Vuister (*et al.*, 1994). El hecho de encontrar dominios conservados en ambas especies es consistente, ya que compartieron un ancestro común alrededor de 72 millones de años (Ming *et al.*, 2008).

El segundo dominio mejor conservado encontrado a partir del alineamiento fue el dominio OD, el cual fue bipartito y con 2 regiones hepta-hidrofóbicas (HR) denominadas HR-A y HR-B, esenciales para la oligomerización y la formación de trímeros (Kotak *et al.*, 2004; Nover *et al.*, 2001).

También se identificó en las secuencias proteicas CpHsfs los residuos básicos K y R característicos de la señal de localización nuclear (NLS), los cuales son esenciales para la importación nuclear. De igual forma se identificó la señal de exportación nuclear (NES), caracterizada por aminoácidos (L) en la región hidrofóbica HR-C (Heerklotz *et al.*, 2001; Mattaj y Englmeier, 1998; Lyck *et al.* 1997).

En esta tesis se observó que las secuencias proteicas Hsfs de la clase A tanto en *A. thaliana* como en *C. papaya* L. cv. SunUp presentaron el dominio de activación en el extremo C-terminal (CTAD), en este se identificó AHA1 y AHA2 con sus aminoácidos conservados como en el caso de los aromáticos W y F así como ácidos E y los hidrofóbicos L, I y V, en la literatura se reporta que la función de activación de los factores de transcripción de la clase A está relacionado con el motivo peptídico llamado AHA (Kotak *et al.*, 2004; Döring *et al.*, 2000; Nover *et al.*, 1997).

Cuando se realizó el árbol filogenético entre *A. thaliana* y *C. papaya* L. cv. SunUp las secuencias de *C. papaya* L. cv. SunUp se agruparon en dos clados principales y 4 subclados. Para la asignación del nombre y la elección de las secuencias involucradas en el estudio de expresión durante el choque térmico para ser estudiadas en esta tesis se consultó la literatura.

La respuesta al estrés térmico en *A. thaliana* es finamente regulada por la activación y represión de los genes hsfs a través de factores de transcripción Hsfs; por ello para estudiar el estrés térmico por incremento de temperatura así como el tiempo de exposición en *C. papaya* L. cv. Maradol en esta tesis, se planteó incluir miembros de las tres clases para el estudio de la expresión de los genes hsfs.

Dado que en tomate *Lycopersicon peruvianum* (hoy reclasificado como *Solanum peruvianum*) el factor de transcripción denominado LpHsfA1a actúa como un regulador

maestro de la respuesta al choque térmico, al regular la biosíntesis de otros factores de transcripción Hsfs como LpHsfA2 y LpHsfB1 así como la producción de proteínas Hsps manteniendo la termotolerancia y regresando la expresión de genes housekeeping después del estrés (recuperación) (Mishra *et al.*, 2002) se decidió incluir en esta tesis, el estudio de la expresión del gen hsfA1a en *C. papaya* L. cv. Maradol.

Para la asignación más probable del nombre, se consultó los porcentajes de la matriz de distancia entre las secuencias de aminoácidos y éstos porcentajes fueron corroborados en el árbol filogenético para cada proteína Hsfs cuyo gen hsf fue elegido. Para el gen hsfA1a se eligió la secuencia identificada con el código "supercontig_90_16" (secuencia nucleotídica con la cual se predijo la proteína) con el mayor porcentaje de identidad a AtHsfA1a en *A. thaliana* (87.46 %) designando a la proteína CpHsfA1a y al gen CphsfA1a.

En la literatura se reporta que los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b en *A. thaliana* son los principales reguladores de la activación inmediata de la transcripción génica en el estrés del choque térmico y en consecuencia determinan la cinética de retroalimentación negativa, que es responsable de la temporalidad de la expresión génica (Lohmann *et al.*, 2004). Por esta razón se incluyó también el estudio de la expresión del gen HsfA1b en *C. papaya* L. cv. Maradol. Se eligió la secuencia "supercontig_43_94" con el el mayor porcentaje de identidad a AtHsfA1b en *A. thaliana* (80.38 %) y se designó a la proteína CpHsfA1b y al gen CphsfA1b.

En *Arabidopsis* el gen AthsfA2 se considera "tardío", su expresión aumenta bajo estrés térmico, su respectivo factor de transcripción parece regular la expresión de un grupo de genes blanco que ampliamente se sobrelapan con aquellos regulados por los factores de transcripción AtHsfA1a y AtHsfA1b (Wunderlich *et al.*, 2007). Schramm *et al.*, (2006) reportaron que AthsfA2 es el gen que se expresa con más fuerza de todos los heat shock factors y el que produce la proteína más estable posterior a la inducción del estrés térmico.

Por ello se incluyó el estudio de la expresión del gen hsfA2 en *C. papaya* L. cv. Maradol. La secuencia con el código "supercontig_7_163" tuvo un porcentaje del 79.52 % con AthsfA2 y se designó a la proteína CpHsfA2 y al gen CphsfA2.

En relación a la clase B, en el genoma de *Arabidopsis* solo hay cinco genes hsfB dos de los cuales son considerados con funciones tempranas (AthsfB3 y AthsfB4) y los otros tres son considerados que actúan como hsfB tardíos (AthsfB1, AthsfB2a, AthsfB2b) (Schramm *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004) porque su expresión de ARNm se incrementa significativamente en el estrés térmico y hay pruebas de que esta expresión aumentada por el calor requiere la acción combinada de los hsfB tempranos de la clase A: AthsfA1a y AthsfA1b (Schramm *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2005; Lohmann *et al.*, 2004).

Para esta tesis se eligieron hsfB1 y hsfB2b para su estudio de expresión en *C. papaya* L. cv. Maradol, principalmente por su acción tardía es decir en etapas posteriores del estrés. La secuencia “supercontig_55_150” presentó el mayor porcentaje de identidad con AthsfB1 (72.37 %) y la secuencia “supercontig_74_64” con AthsfB2b (85.94 %), designado de esta manera las dos proteínas como CpHsfB1 y CpHsfB2b y los genes CphsfB1 y CphsfB2b, respectivamente.

Un hecho más, para justificar la elección de estos dos miembros de la clase B es que en tomate el factor de transcripción LsHsfB1 actúa como coactivador de la transcripción mientras que en *Arabidopsis* AtHsfB1 es un represor transcripcional (Czarnecka-Verner *et al.*, 2004; Bharti *et al.*, 2004; Czarnecka-Verner *et al.*, 2000). En *Arabidopsis*, el gen AthsfB1 es el más fuertemente inducido por calor de los HsfB clase B (Busch *et al.*, 2005).

Finalmente se decidió incluir a la clase C, que en el caso de *A. thaliana* es sólo un gen y su respectivo factor de transcripción. La secuencia con el mayor porcentaje de identidad a AtHsfC18 (78.66 %), fue “supercontig_1780_1”, la designación a esta secuencia fue CpHsfC1 en el caso de la proteína y CphsfC1 para el gen.

V.1.1 Efecto sobre la fisiología y expresión de genes hsfB en *Carica papaya* L. cv. Maradol por incremento de temperatura y tiempo de exposición.

Una vez elegidos los 6 genes para el estudio de su expresión: CphsfA1a, CphsfA1b, CphsfA2, CphsfB1, CphsfB2b y CphsfC1, se determinó el punto de estrés térmico (estrés severo) en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol, siendo a las 4 h de recuperación (a 25 °C) una vez concluida la exposición de 50 °C durante 4 h, en este punto la

afectación fue de un 38.4 % en el valor de F_v/F_m y no hubo pérdidas de hojas, además las plantas pudieron recuperarse, permitiendo evaluar el efecto en el estrés moderado (antes del punto de estrés térmico), en el punto de estrés térmico y en la etapa de recuperación.

Finalmente se presentan la figura V.1, con el objetivo de integrar los principales resultados tanto fisiológicos como de expresión de genes encontrados en esta tesis, se eligió hoja para hacerlo por su contribución como tejido, al desarrollo general de esta especie de estudio, además fue el tejido que incluyó la totalidad de mediciones fisiológicas realizadas en la presente tesis. Se recalca que en esta figura se encuentran diversas escalas dado los diferentes parámetros fisiológicos medidos y el objetivo de la figura es dar un panorama general de las afectaciones.

En esta tesis cuando las mediciones y colectas se realizaron en la temperatura control que fue la misma para el tiempo cero (T_0), es decir 25 °C, se consideró una temperatura no estresante. Las plantas recibieron un choque térmico con una temperatura de 50 °C durante 1 h y las mediciones y colectas del tejido se realizaron al término de 1 h de exposición (sin regresar a 25 °C) y se consideró como la etapa de estrés moderado.

También las plantas fueron expuestas a 50 °C durante 4 h entonces las mediciones y colectas del tejido se realizaron a las 4 h de recuperación y 1 semana de recuperación (168 h), por recuperación se refiere a que las plantas fueron regresadas a 25 °C una vez concluido el choque térmico. A 4 h de recuperación se consideró como el punto de estrés térmico (estrés severo) y 1 semana de recuperación (168 h) como la etapa post estrés.

En la figura integradora se puede observar que en el punto de estrés térmico (4 h recuperación) la mayoría de los parámetros fisiológicos tendieron a disminuir a excepción de carotenoides y fuga de electrolitos, los cuales tendieron a aumentar. Mientras que en la mayoría de los genes se encontró un aumento de expresión a 1 semana de recuperación.

El parámetro que más disminuyó en comparación con el T_0 , aún en la etapa del post estrés, fue la conductancia estomática, esta disminución representó un 88.78 % en el punto del estrés térmico y un 88.5 % en el post estrés y no incrementó de nuevo su valor.

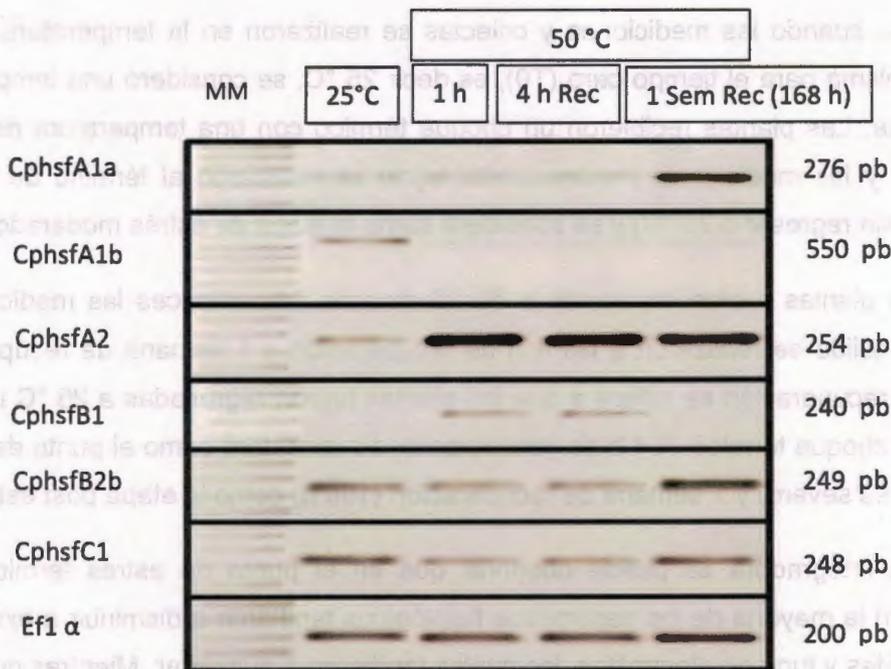
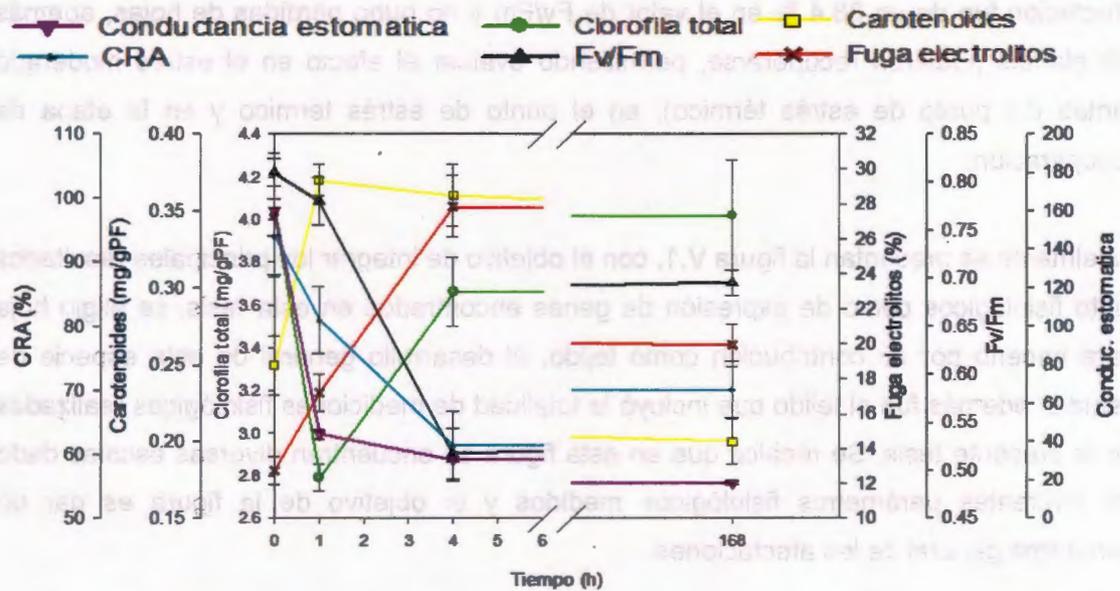


Figura V.1 Integración del análisis fisiológico y molecular en hoja de plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Mardol. En la parte superior se encuentran los parámetros fisiológicos con sus respectivas unidades y escalas mientras que en la parte inferior se encuentran los diferentes patrones de expresión de genes hsf, indicando el nombre de cada gen hsf, el fragmento esperado en pb y el marcador de peso molecular (MM) utilizado (1 kb plus).

La medición de la conductancia estomática, aporta información a nivel externo de la hoja indicando la apertura de los poros estomáticos, por donde la hoja controla procesos internos fundamentales para el desarrollo vegetal como el intercambio de CO₂ en la fotosíntesis y vapor de agua durante la transpiración y aún más importante es, que el poro estomático constituye un regulador térmico (Raschke, 1975).

Tales funciones dependen del mecanismo de apertura y cierre del poro estomático, el cual se controla por cambios en la turgencia de las células oclusivas, conforme el déficit hídrico aumenta, la conductancia estomática decrece rápidamente como un mecanismo para evitar la pérdida de agua (Assmann y Gershenson, 1991). La disminución de la conductancia estomática está relacionada con la pérdida de turgencia pero también al aumento en la concentración de ácido abscísico (ABA), éste se acumula en el apoplasto que rodea las células epidérmicas de la hoja, las células guardas reconocen el ABA y responden mediante el cierre estomático. (Liang *et al.*, 1997; Cowing *et al.*, 1993). La disminución en la conductancia en esta tesis es consistente con las mediciones del contenido relativo de agua el cual disminuyó en relación a T₀, 13.78 %, 34.76 % y 25.32 % en cada una de las 3 etapas evidenciando pérdida de turgencia debida a una mayor pérdida de agua inducida por el aumento de temperatura.

La disminución de la conductancia estomática observada en esta tesis implicó el cierre de los estomas y pérdida de agua, ya que al disminuir la turgencia celular, el poro se cierra, reflejando que las plantas pierden capacidad de transpirar y de traslocar el agua suficiente desde las raíces para satisfacer las tasas de transpiración (Smart y Robinson, 1991). El cierre de los estomas, según Souza (*et al.*, 2004) puede ocasionar baja asimilación de CO₂ y crear un desbalance entre la actividad fotoquímica en el fotosistema II y el requerimiento de electrones conduciendo a una sobre excitación y daño a los centros de reacción del fotosistema II.

En organismos fotosintéticos oxigénicos como las plantas, se debe recordar que cada fotosistema está formado por un centro de reacción fotoquímico y un complejo antena; el centro de reacción contiene una clorofila a, que en el caso del fotosistema se designa P700 y en el caso del fotosistema II P680, esto en base a sus máximos de absorción,

mientras que los complejos antena contienen tanto clorofila del tipo a y b así como carotenoides. La función de los complejos antena es proporcionar eficientemente energía a los centros de reacción a los que están asociados. Por lo tanto el cierre estomático puede afectar el centro de reacción aunque también éste último puede ser afectado por la tasa entre formación y descomposición de clorofilas provocada por altas temperaturas. Se sabe que el estrés por calor reduce el contenido de clorofila al inhibirse la biosíntesis de la clorofila a 42 °C debido a la inactividad de la enzima de porfobilinógeno deaminasa y por lo tanto la disminución del contenido de protoclorofilide (Tewari y Tripathy, 1998).

En relación a los pigmentos, el contenido total de clorofilas (clorofila a + clorofila b) se vio más afectado en la etapa de estrés moderado (1 h), representado por el mayor porcentaje de disminución, esta disminución fue del 30.74% en relación al T0 mientras que en la etapa del punto de estrés térmico fue 8.98 % en relación a T0 y en la etapa del post estrés el valor fue el mismo que en T0 indicando total recuperación para este parámetro medido en esta última etapa. La disminución de las clorofilas totales particularmente en la etapa del punto del estrés térmico, coincidió con una disminución en la fluorescencia de la clorofila a F_v/F_m . La disminución de F_v/F_m fue del 3.70 % en el estrés moderado, 36.11 % en el punto de estrés térmico y 14.19 % en el post estrés, en relación a T0 indicando que este valor se recuperó de manera parcial en el post estrés.

Dado que dentro del proceso fotosintético la relación F_v/F_m se considera como una medida cuantitativa de la eficiencia fotoquímica del FS II (Schreiber y Bilger, 1993) la mayor afectación en el punto de estrés térmico reflejó el declinamiento del funcionamiento de las reacciones fotoquímicas primarias (Berry y Bjorkman, 1980; Weis y Berry, 1988) indicando fotoinhibición temporal (reversible) (Mohammed *et al.*; 1995; Osmond, 1994). El aumento del valor de F_v/F_m en la etapa del post estrés evidenció la capacidad de las plantas de incrementar su eficiencia fotoquímica (aumento de la respuesta fotoinhibitoria), bajo estas condiciones de estudio. La disminución de F_v/F_m por estrés térmico está relacionada con la reducción en capacidad de atrapar energía, debido a cambios en el complejo antena (Havaux, 1993; Armond *et al.*, 1980) cambios en los centros de reacción (Goltsev *et al.*, 1994; Bukhov *et al.*, 1990; Cao y Govindjee, 1990) así como a la separación irreversible del complejo antena con el centro de reacción del FS II.

La recuperación parcial de Fv/Fm señala una afectación breve pero reversible del FS II presumiblemente en el complejo cosechador de luz provocada por el aumento de temperatura, sugiriendo que los eventos fotoquímicos limitaron la completa recuperación de la eficiencia fotoquímica del FS II (Camejo *et al.*, 2005), probablemente relacionado también a la recuperación de la proteína D1.

En la literatura se reporta que la disminución en la capacidad de absorción de energía afecta a la cadena de transportes de electrones y la sobre reducción de sus intermediarios, favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (O_2) originadas por la reactividad del ozono (O_3) con O_2 en términos de H_2O_2 , superóxido, singulete de oxígeno y radicales hidroxílicos, cada uno de los cuales pueden producir daño por oxidación en genes alterando la configuración aminoacídica de proteínas. El O_3 es altamente reactivo y puede producir oxidación de ácidos grasos a peróxidos lipídicos alterando altamente la fluidez de las membranas como las membranas tilacoides de los fotosistemas, dañar enzimas como la Rubisco y descontrolar los mecanismos de apertura y cierre de los estomas entre otros efectos.

Las plantas reducen o eliminan estas especies reactivas con un sistema antioxidante eficiente, como pigmentos carotenoides o enzimas antioxidantes (Havaux, 1993) sugiriendo con ello, que la falla en el sistema antioxidante puede ser un factor para la disminución de la eficiencia fotoquímica del FS II (menor valor de Fv/Fm).

En la figura V.1 puede observarse que los carotenoides aumentaron por igual tanto en la etapa de estrés térmico (45.83 %) y en el punto de estrés térmico (44.87 %) en relación al T0 mientras que en la etapa post estrés se registró el mismo valor a T0 (0.34 %) es decir el nivel de los carotenoides descendió a valores iniciales. De no poder disminuir las especies reactivas por medio de carotenoides y enzimas, en caso extremo, la proteína D1 del fotosistema II debe aceptar dichos productos a costa de su propia destrucción con resultante fotoinhibición. Aunque en condiciones normales los carotenoides desempeñan un papel importante en el complejo colector de luz pues son antenas alternativas en el espectro de luz entre 450 y 500 nm, en el cual las clorofilas absorben poco, el aumento de carotenoides en *C. papaya* L. cv. Maradol podría deberse a su rol en la fotoprotección de los fotosistemas, varios estudios han mostrado que estos compuestos son importantes en

proteger el aparato fotosintético contra el fotodaño, por inter conversiones entre las moléculas de xantofila (Ort, 2001; Young *et al.*, 1997).

El aumento de los carotenoides como una manera de contrarrestar un posible daño membranal, queda demostrado por un aumento en la fuga de iones en las plantas de *C. papaya* L. cv. Maradol el incremento fue de un 118.92 % a las 4 h de recuperación y de un 56.51 % a 1 semana de recuperación, indicando daño a la membrana en particular a las 4 h de recuperación. El incremento de la fuga de electrolitos por el aumento de la permeabilidad de la membrana es explicado a un aumento en la producción de radicales libres, los cuales llevan a una peroxidación de los lípidos de la membrana por medio de la oxidación de los ácidos grasos insaturados.

Existe evidencia en las plantas, que los factores de transcripción Hsfs además del calor están relacionados al estrés oxidativo (Miller and Mittler, 2006) por ejemplo HsfA1b está implicado en la regulación de expresión del gen APX2, el cual codifica para la enzima Ascorbato peroxidasa para la depuración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el citosol (Panchuk *et al.*, 2002) y HsfA4a también se ha reportado como un sensor molecular de H_2O_2 en plantas (Davletova *et al.*, 2005). También ha sido mostrado que HsfA2 juega un importante rol en respuesta al estrés oxidativo y varios tipos de estrés (Li *et al.*, 2005).

En esta tesis el gen CphsfA2 presentó un aumento de expresión, el cual se mantuvo en las tres etapas evaluadas en relación a T0 sugiriendo un importante papel en el sentido del aumento de temperatura y posiblemente estrés oxidativo mientras que CphsfA1b disminuyó en las 3 etapas en relación al T0 a una temperatura de 25 °C, indicando su poca participación en el estrés. Los genes CphsfA1a CphsfB2b y CphsfC1 aumentaron a 1 semana de recuperación (168 h) evidenciado su participación en la etapa de post estrés mientras que CphsfB1 aumentó a 1 h y 4 h de recuperación indicando un papel en etapas de estrés pero no en la etapa posterior de recuperación (168 h).

V.2 CONCLUSIÓN GENERAL

En este Capítulo V integrador, se responden finalmente las preguntas planteadas al principio de esta tesis. Como se observó en el Capítulo II, en el análisis bioinformático, se encontraron presentes los genes *hsfs*, homólogos a los reportados en *Arabidopsis thaliana*, dentro del genoma de *C. papaya* L. cv. SunUp. Se identificaron 18 genes *Cphsfs* y 18 proteínas *CpHsfs*. Las proteínas fueron clasificadas en 3 clases (A, B y C) en base a sus dominios característicos y relación filogenética. En esta tesis se reporta por primera vez de manera integradora la caracterización *in silico*, identificación y relación filogenética de todos los posibles miembros de la familia heat shock factors involucrados en la respuesta del choque térmico dentro del genoma secuenciado en *C. papaya* L. cv. SunUp.

En el Capítulo III fisiológico se determinó, en plantas jóvenes de *C. papaya* L. cv. Maradol, como punto de estrés térmico a las 4 h de recuperación (4 h 50 °C + 4 h 25 °C), en este punto la afectación fue de 38.4 % en el principal parámetro fisiológico medido (*Fv/Fm*), y se consideró como estrés severo y en base a esto se evaluó el efecto sobre la fisiología y papel que desempeñan 6 genes en 3 etapas de estrés térmico: estrés moderado, estrés severo (punto de estrés térmico) y post estrés.

Se evaluaron varios parámetros fisiológicos que permitieran relacionar si los cambios en los niveles de expresión de los genes *hsfs* evaluados, efectivamente se deben a que las plantas estuvieron expuestas a un determinado grado de estrés. Se encontró que la conductancia estomática fue el primer parámetro afectado desde el estrés moderado, disminuyó junto a un grupo de parámetros los cuales se vieron más afectados en el estrés severo como el contenido relativo de agua, contenido total de clorofilas, la fluorescencia de clorofila a (*Fv/Fm*) mientras que en esta etapa también se observó un aumento de carotenoides y fuga de electrolitos evidenciado el daño membranal.

En esta tesis el gen *CphsfA2* mantuvo un aumento de expresión en las tres etapas evaluadas en relación a T0 sugiriendo un importante papel en el sentido del aumento de temperatura y estrés oxidativo mientras que *CphsfA1b* disminuyó en las 3 etapas en relación al T0 a una temperatura de 25 °C, indicando su poca participación en el estrés.

Los genes CphsfA1a CphsfB2b y CphsfC1 aumentaron a 1 semana de recuperación (168 h) evidenciado su papel en el post estrés mientras que CphsfB1 aumentó a 1 h y 4 h de recuperación indicando un rol en etapas de estrés pero no en la etapa posterior a este.

Por el momento en esta tesis se presentó una primera aproximación en cuanto a la relación entre la afectación fisiológica y de expresión de genes y las conclusiones aquí presentadas engloban de manera general lo encontrado en este estudio. Se plantea para estudios posteriores la correlación de manera cuantitativa a partir de cambios observados en la expresión génica molecular medida en tiempo real y hacer análisis estadísticos de varianzas en todos los parámetros fisiológicos para encontrar diferencias significativas.

Sin embargo la rápida y reversible recuperación en varios parámetros fisiológicos así como el papel de varios genes hsfs en la etapa del estrés y post estrés observados en las plantas durante altas temperaturas podría explicar la gran tolerancia de *C. papaya* L. cv. Maradol aún a temperaturas de 50 °C, en ambientes tropicales y aporta nueva información incluso para el estudio y generación de plantas tolerantes del estrés térmico.

V.3 PERSPECTIVAS

Análisis fisiológico

- Incluir el análisis por separado de F_0 , F_v y F_m en hoja, para conocer a detalle en que paso del proceso fotosintético ocurre el daño en los fotosistemas.
- Medir fotosíntesis (tasa fotosintética) en hoja, así como realizar los cálculos de la respiración (proceso inverso a la fotosíntesis).
- Medir cantidad de ácido abscísico (ABA) en hoja, para complementar el estrés térmico y senescencia foliar.
- Incluir la evaluación de la relación de la clorofila a / clorofila b como medida de daño al fotosistema II, en los 4 tejidos: hoja, peciolo, tallo y hoja.

- Medir Malonildialdehído (MDA) para complementar el daño a la membrana en los 4 tejidos

Análisis molecular

- Clonar las secuencias de los 6 genes hsfs por el método de Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) y secuenciarlas.
- Análisis de la expresión en tiempo real (RT-qPCR) de los 6 genes hsfs en los 4 tejidos sometidos a los diferentes regímenes de temperatura y tiempo de exposición térmico y con ello poder clasificar estos genes tanto en tempranos o tardíos según sea el caso, como se encuentran en *Arabidopsis*, el modelo de comparación de esta tesis, confirmando de esta manera su rol de manera cuantitativa en etapas de estrés moderado, severo o etapas posteriores al estrés.

IV.5 REFERENCIAS

- Akerfelt, M., Trouillet, D., V. Mezger y L. Sistonen (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1113, 15–27.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Armond, P. A., Björkman, O. y L. A. Staehelin (1980). Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 601, 433–442.
- Aro, E. M., S. McCaffery y J. M. Anderson (1993). Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiol.* November; 103,3, 835–843.
- Assmann, S. M. y A. Gershehson (1991). The cinetics of stomatal responses to VPD in *Vicia faba*: electrophysiological and water relations models. *Plant Cell* 14:455–465.
- Berry, J. y O. Bjorkman (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31, 491–543.
- Camejo, D., Rodriguez, P., Angeles, M., Dell'Amico, J. M., A. Torrecillas y J. J. Alarcón (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.*, 162, 281–289.

- Chan-Schaminet, KY; Baniwal, SK; Bublak, D; L. Nover y K-D. Scharf (2009) Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression. *J Biol Chem*, 284, 20848-20857.
- Cao, J. y B. Govindjee (1990). Chlorophyll a fluorescence transients an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1015, 180-188.
- Cicero, M. P., Hubl, S. T., Harrison, C. J., Littlefield, O., J. A. Hardy y H. C. Nelson (2001) The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic Acids Res.*, 29, 1715–1723.
- Cowing, D. J. G., H. G. Jones y W. J. Davies (1993). Xylem transported abscisic acid: The relative importance of its mass and its concentration in the control of stomatal aperture. *Plant Cell Environ.*, 16, 453-459.
- Damberger, F. F., Pelton, J. G., Harrison, C J., H. C. Nelson y D. E. Wemmer (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.*, 3, 1806–1821.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., K, Schlauch y R Mittler (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell* 17, 268–281.
- Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., A. Chen y L. Nover (2000) The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell*, 12, 265–278.
- Goltsev, V., Yordanov, I. y T. Tsonev (1994). Evaluation of relative contribution of initial and variable chlorophyll fluorescence measured at different temperatures. *Photosynthetica*, 30, 629-643.
- Govindjee, (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol*, 22, 131–160.
- Harrison, C. J., A. A. Bohm y H C. Nelson (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor; *Science* 263 224–227.
- Havaux, M., M. Ernez y R. Lannoye (1988). Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. *J. Plant Physiol*, 133, 555–560.
- Heerklotz, D., Döring, P., Bonzelius, F., S. Winkelhaus y L. Nover (2001). The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2; *Mol. Cell. Biol.*, 21. 1759–1768.

- Hsu, A. L., C. T. Murphy y C. Kenyon (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300, 1142–1145.
- Jedlicka P, Mortin MA, Wu C (1997) Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* 16:2452–2462.
- Koskull-Döring, P., Scharf, K.-D., and Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.* 12, 452–457.
- Li, C., Chen, Q., Gao, X., Qi, B., Chen, N., Xu, S., J. Chen y X. Wang (2005). AtHsfA2 modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in Arabidopsis. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 48, 540–550.
- Liang, J., J. Zhang y M. H. Wong (1997). How do roots control xylem sap ABA concentration in response to soil drying? *Plant Cell Physiol.*, 38, 10-16.
- Lin, Y.-X., Jiang, H.-Y., Chu, Z.-X., Tang, X.-L., S.-W. Zhu y B.-J. Cheng (2011). Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. *BMC Genomics*, 2011, 12:76.
- Liu, L., M. J. White y T. H. MacRae (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem*, 262, 247-257.
- Littlefield, O. y H. C. Nelson (1999). A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocystal; *Nature Struct. Biol.*, 6, 464–470.
- Lyck, R., Harmening, U., Höhfeld I, K.-D. Scharf y L. Nover (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two tomato heat stress transcription factors; *Planta*, 202, 117–125.
- Mattaj I. W. y L. Englmeier (1998). Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase; *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 265–306.
- Ming, R., *et al.*, (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190), 991–996.
- Miller, G. y R. Mittler (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?. *Annals of Botany* 98, 279–288.
- Mishra, S. K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., L. Nover y K. D. Scharf (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HSFA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev*, 16, 1555–1567.
- Mohammed, G.D., W.D. Binder y L. Gillies (1995). Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. For. Res*, 10, 383–410.

- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., A. Ganguli y K-D. Scharf (2001) *Arabidopsis* and the Hsf world: How many heat stress transcription factors do we need?; *Cell Stress Chap.*, 6, 177–189.
- Nover, L. y K-D. Scharf (1997). Heat stress proteins and transcription factors; *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 80–103.
- Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., E. Czarnecka-Verner y W.B. Gurley (1996). The Hsf world: Classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones*, 1, 215–223.
- Nover, L (1991). *Heat shock response* (Boca Raton: CRC Press).
- Nover, L., D. Neumann y K-D. Scharf (eds) (1989a). *Heat shock and other stress response systems of plants* (Berlin: Springer).
- Nover, L., K-D. Scharf y D. Neumann (1989b) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs; *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1298–1308.
- Ort, D (2001). When there is too much light. *Plant Physiol*, 125, 29–32.
- Osmond, C.B (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants, in: N.R. Baker and J.R. Bowyer (eds.). *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom. pp. 1–24.
- Panchuk, I., R. Volkov y F. Schöffl (2002). Heat stress and HSFdependent expression of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129, 838–853.
- Pirkkala, L., P. Nykanen y L. Sistonen (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal* 15, 1118–1131.
- Raschke, K. (1975). Stomatal action. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 309-40.
- Scharf, K. D., Berberich, T., I. Ebersberger y L. Nover (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 104–119.
- Schreiber, U. y W. Bilger (1993). Progress in chlorophyll fluorescence research during the past years in retrospect. *Prog. Bot.*, 54, 151–173.
- Schultheiss, J., Kunert, O., Gase, U., Scharf, K.-D., L. Nover y H. Rüterjans (1996). Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24. *Eur. J. Biochem.*, 236, 911–921.
- Smart, R. E. (1974). "Aspects of water relations of the grapevine (*Vitis vinifera*)."
Am. J. enol. Vitic, 25,2, 84-91.

- Sorger, P. K. y H. R. Pelham (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell*, 54, 855–864.
- Souza, R. P., Machado, E. C., Silva, J. A., A. M. Lagôa, y J.A. Silveira (2004). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environ. Exp. Bot.* 51, 45-56.
- Tewari, A. K. y B. C. Tripathy (1998) Temperature-Stress-Induced Impairment of Chlorophyll Biosynthetic Reactions in Cucumber and Wheat. *Plant Physiol.*, 117, 851–858.
- Vuister, G. W., Kim, S. J., Orosz, A., Marquardt, J., C. Wu y A. Bax (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor; *Nature Struct. Biol.*, 1, 605–614.
- Wang, C., Q. Zhang y H-X. Shou (2009). Identification and expression analysis of OsHsfs in rice. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10,4, 291-300.
- Weis, E. y J. Berry (1988). Plants and high temperature stress, In: S.P. Long and F. I. Woodward (eds.), *Symp. Soc. Expt. Biol.* No. XXXXII, Cambridge Univ. Press, Cambridge, United Kingdom. pp. 329–346.
- Wiederrecht, G., D. Seto y C. S. Parker (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell*, 54, 841–853.
- Willits, D. H y M. M. Peet (2001). Measurement of Chlorophyll Fluorescence as a Heat Stress Indicator in Tomato: Laboratory and Greenhouse Comparisons *J. AMER. SOC. HORT. SCI.*, 126,2,188–194.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 441–469.
- Xin, H., Zhang, H., Chen, L., Li, X., Lian, Q., Yuan, X., Hu, X., Cao, L., X. He y M. Yi (2010). Cloning and characterization of HsfA2 from Lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Rep*, 29, 875–885.
- Young, A., D. Phillip y J. Savill (1997). Carotenoids in higher plant photosynthesis. In: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, pp. 575–596.
- Zhu, B., Ye, C., Lü, H., Chen, X., Chai, G., J. Chen y C. Wang (2006). Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, GmHsfA1, in soybeans (*Glycine max*). *J Plant Res*, 119:247–256.

La emoción más hermosa y más profunda que podemos experimentar es la sensación de lo místico. Es el legado de toda ciencia verdadera. Aquel al que su emoción le es conocida, que ya no se pregunta ni está en estática reverencia, vale tanto como si estuviera muerto. Tener el conocimiento y el sentimiento de que lo que es impenetrable para nosotros realmente existe, que se manifiesta en la suprema sabiduría y en la más radiante belleza que nuestras torpes facultades sólo pueden comprender en sus formas más primitivas, está en el centro de toda verdadera religiosidad.

Albert Einstein
Ciencia y Fe
(1879-1955)

