



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA
FISIOLÓGICA POR ESTRÉS ABIÓTICO Y LA
PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HSF EN *Carica
papaya* L.**

Tesis que presenta

YESSICA BAUTISTA BAUTISTA

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Yessica Bautista Bautista** titulado **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA POR ESTRÉS ABIÓTICO Y LA PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HSF EN *Carica papaya*, L** fue realizado en el **Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular** de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de investigación en agrobiotecnología, bajo la dirección del **Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández**, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de octubre de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Yessica Bautista', is written over a horizontal line.

Yessica Bautista Bautista

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mi formación como Maestro en Ciencias Biológicas, con número 702302, así como por el financiamiento del Proyecto CONACYT de Científica Básica: Estudio del transcriptoma y proteoma de papaya (*Carica papaya* L.) en respuesta a estrés hídrico: identificación de genes con potencial para mejorar su eficiencia en el uso de agua. Con número CB 2013-01/ 221208. Al Proyecto 70197: Fortalecimiento de la infraestructura de los Laboratorios de Fisiología Vegetal Molecular de la Unidad de Biotecnología y de Virología Molecular de la Unidad de Bioquímica, del Fondo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del CICY.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C (CICY), por la oportunidad de formarme, a los directivos, profesores, técnicos y administrativos que, con su sabiduría, consejos y apoyo, motivaron a desarrollarme en lo profesional.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus Campeche, por facilidades otorgadas, en especial a la Dra. Aída Martínez Hernández.

Expreso mi profundo agradecimiento al Dr. Jorge Santamaría Fernández, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, por el apoyo y confianza para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz, por la valiosa orientación y apoyo en las salidas de campo y laboratorio. Por su tiempo y dedicación en la revisión de este trabajo.

A mi comité de Tutorial, conformado por el Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Fabio Marcelo Idrovo Espín y Dr. Jorge Santamaría Fernández, por sus valiosas aportaciones en cada uno de los exámenes tutorales.

Al Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Fabio Marcelo Idrovo Espín, Dr. Carlos Trejo López, Dr. Santy Peraza Echeverría y al Dr. Jorge Santamaría Fernández, por su tiempo para la retroalimentación del manuscrito y fungir como miembros del jurado evaluador.

Al Ing. Gastón Alejandro Herrera Herrera y M.C. Carlos Talavera May, Francisco Espadas Gil, por sus comentarios y apoyo técnico en el manejo de los equipos fisiológicos y en la orientación de cultivo de tejidos. Al Ing. Roberth Armando Us Santamaría por capacitarme y ayudarme en el uso del equipo IRGA.

A los Ings. Juan Manuel Molina Amaro, Cándido Gamaliel Torres Sánchez y Luis Samuel Flores Mena, les agradezco profundamente su colaboración y apoyo técnico en la reunión de las piezas necesarias para la construcción de una cámara térmica, elemento fundamental para finalizar mis experimentos.

Al Ing. Fernando Almícar Contreras Martín y a su equipo de trabajo por brindarme el apoyo técnico y uso de las instalaciones, así como las recomendaciones de fertilización y la ayuda en el crecimiento de las plantas. Al M.C Rodolfo Martín Mex por apoyarme y asesorarme en la fertilización, riego y llevar conmigo el seguimiento del crecimiento de mis plantas.

A los Dres. Arianna Chan León y Humberto Estrella Maldonado, por su asesoramiento en el diseño de primers y sus acertadas retroalimentaciones, a la M. C Amaranta Girón Ramírez por sus enseñanzas en el área de biología molecular por resolverme más de una duda, al Ing. Eddy Jovanny Turrent por escucharme y apoyarme. A ustedes colegas, compañeros y amigos de laboratorio, gracias por hacerme sentir como en casa, por todas las risas y discusiones científicas compartidas.

A mis amigos de generación 2018-I, Q.F.B Areli Robles Romero, Biól. Rufino Gómez, Biól. Antonio Reyes, por todo lo aprendido juntos, por todas las porras de apoyo, por cuidarme siempre, gracias por hacerme sentir en familia, por todas las aventuras vividas durante mi estancia en el CICY.

A mis amigos, Lic. Yessica Yazmín Montano, M.C. Alonso Armas Silva, Lic. Eliseo Mendoza, M.C. José Felipe Pacheco Morales, Dr. Luis Manzanares, Dr. Samuel Gamboa Tuz y a todas las personas que han participado en mi crecimiento personal y profesional, gracias por sus asesoramientos en el área estadística, por compartir conmigo clases de redacción de artículos científicos y todas sus experiencias, gracias por sus palabras de apoyo y consejos.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres: Maria Luisa Bautista Calderón y Salvador Bautista Herrera por ser mi ejemplo de trabajo, dedicación y esfuerzo. Les agradezco con mucho amor y cariño todo lo que han hecho por mi. A mis hermanos por ser mi ejemplo de superación, y mi apoyo incondicional. A mis sobrinos, Barbara Hadaly, Nasly Shareni y Gastón por llenar nuestros corazones de alegría, a Leonardo por acompañarnos siempre y guiarnos desde el cielo.

ÍNDICE	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XII
RESUMEN.....	I
ABSTRACT	I
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DE ESTRÉS ABIÓTICO Y LA PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HSF EN <i>Carica papaya</i> L.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. ANTECEDENTES GENERALES.....	4
1.2.1. Estrés abiótico en plantas	4
1.2.2. Sequía	5
1.2.3. Temperaturas Extremas.....	7
1.2.4. Sequía y altas temperaturas.....	8
1.2.5. Factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico	10
1.2.6. Factores de transcripción de choque térmico: HSF	11
1.2.7. Identificación y estructura de la familia HSF	13
1.2.8. Genes HSF involucrados en la tolerancia a estrés hídrico y térmico	15
1.3.1 Origen y distribución de <i>Carica papaya</i> L.....	17
1.3.2 Clasificación taxonómica.....	17
1.3.3 Descripción morfológica.....	18
1.3.4 Requerimientos edafoclimáticos.....	20
1.3.5 Temperatura	20
1.3.6 Luz.....	21
1.3.7 Suelo.....	21
1.3.8 Humedad	21
1.4 Producción mundial de papaya	22
1.4.1 Producción e importancia económica de Papaya en México	23
1.4.2 Producción de Papaya en Yucatán	24
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	25

1.6	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	26
1.7	HIPÓTESIS	26
1.8	OBJETIVOS	27
1.8.1	Objetivo General	27
1.8.2	Objetivos Específicos	27
1.9	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN <i>in silico</i> DE LA FILOGENIA Y LA ESTRUCTURA DE LAS SECUENCIAS DE GENES QUE CODIFICAN A LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE TIPO HSF OBTENIDOS DE UN TRANSCRIPTOMA DE <i>C. papaya</i> L. EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO.		
2.1.	INTRODUCCIÓN	29
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.2.1	Búsqueda de secuencias de genes de choque térmico (HSF)	31
2.2.2	Divergencia de genes de choque térmico de <i>Carica papaya</i> L.	31
2.2.3	Alineamiento de secuencias proteicas de genes HSF	31
2.2.4	Análisis filogenéticos de la familia HSF de <i>Carica papaya</i> L.....	31
2.2.5	Modelaje tridimensional de proteínas HSF de <i>Carica papaya</i> L.	32
2.3	RESULTADOS	33
2.3.1	Factores de transcripción HSF de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L.	33
2.3.2	Divergencia de genes HSF de <i>Carica papaya</i> L.	33
2.3.3	Alineamiento de genes HSF en <i>Carica papaya</i> L.	35
2.3.4	Análisis filogenéticos de la familia HSF de <i>Carica papaya</i> L.....	44
2.3.5	Análisis filogenéticos de las secuencias HSF en respuesta a estrés hídrico. .	46
2.3.6	Modelos estructurales de las tres clases de proteínas HSF	47
2.3.7	Predicción de localización de la familia de genes HSF en <i>Carica papaya</i> L. ..	49
2.4	DISCUSIÓN	51
2.5	CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO III CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR DÉFICIT HÍDRICO Y RECUPERACIÓN SOBRE LA FISIOLÓGÍA Y LA EXPRESIÓN DE GENES HSF DE LA LÍNEA TIPO C7 <i>Carica papaya</i> L.		
3.1	INTRODUCCIÓN	57
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	60
3.2.1	Material Vegetal	60

3.2.2	Aclimatación de plantas de <i>Carica papaya</i> L.....	60
3.2.3	Caracterización del estrés por déficit hídrico	60
3.3	Análisis fisiológicos	61
3.3.1	Potencial hídrico (MPa).....	61
3.3.2	Fluorescencia de clorofila.....	61
3.3.3	Fotosíntesis (Pn).....	61
3.4	Análisis molecular	62
3.4.1	Extracción de ácidos nucleicos	62
3.4.2	Síntesis de DNAc.....	62
3.4.3	Diseño de oligonucleótidos de genes CpHSF de <i>Carica papaya</i> L.....	62
3.4.4	Validación y análisis de expresión por RT-PCR	63
3.5	RESULTADOS	64
3.5.1	Respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico	64
3.5.2	Potencial Hídrico.....	65
3.5.3	Fluorescencia de clorofila.....	66
3.5.4	Fotosíntesis (Pn), Conductancia Estomática (g_s), CO_2 Intercelular (Ci) y Transpiración (E).....	67
3.5.5	Análisis de pureza de RNA.....	69
3.5.6	Validación de oligonucleótidos HSF	73
3.5.7	Expresión de genes HSF en plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. expuestas a un estrés por déficit hídrico.....	75
3.6	DISCUSIÓN	78
3.6.1	Cambios morfológicos y fisiológicos.....	78
3.6.2	Cambios en la expresión de genes HSF	80
3.7	CONCLUSIONES	85
	CAPÍTULO IV CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO, TÉRMICO Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS, SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE DOS GENOTIPOS DE <i>Carica papaya</i> L. Y LA EXPRESIÓN DE GENES HSF	87
4.1	INTRODUCCIÓN	87
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
4.2.1	Material Vegetal	89
4.2.2	Germinación de las semillas de <i>Carica papaya</i> L.....	89
4.2.3	Aclimatación de plantas de <i>Carica papaya</i> L.....	90

4.2.4	Caracterización de estrés térmico, hídrico y combinado en genotipos Maradol y silvestre.....	90
4.3	Análisis fisiológicos	91
4.3.1	Potencial hídrico (MPa).....	91
4.3.2	Contenido Relativo de agua (CRA)	91
4.3.3	Eficacia del aparato fotosintético: Fluorescencia de clorofila (Fv/Fm).....	91
4.3.4	Fotosíntesis (Pn).....	92
4.3.5	Fuga de electrolitos.....	92
4.3.6	Aislamiento de RNA.....	93
4.3.7	Curva estándar para determinar la eficiencia del PCR en tiempo real.....	93
4.3.8	Diseño de experimento para RTq-PCR.....	93
4.4	RESULTADOS	95
4.4.1	Caracterización de la exposición de estrés hídrico y térmico, sobre la morfología de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L.....	95
	97	
4.4.2	Estado hídrico de la planta en respuesta a la exposición de estrés abiótico en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L.....	98
4.4.3	Estado fotoquímico del fotosistema II y su índice de rendimiento PI_{abs} en plantas de <i>Carica papaya</i> L. en respuesta a estrés abiótico	101
4.4.4	Cuantificación del rendimiento de fotosistema II mediante las curvas OJIP .	104
4.4.5	Fuga de iones en plantas de <i>Carica papaya</i> L. en respuesta a estrés abiótico.....	108
4.4.6	Fotosíntesis (Pn), Conductancia Estomática (g_s), CO_2 intercelular (C_i) y Transpiración (E).....	110
4.4.7	RNA en plantas de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre	114
4.4.8	Validación de los oligonucleótidos para RTq-PCR	118
4.4.9	Análisis de expresión de los factores de transcripción HSF en respuesta a estrés abiótico	120
4.4.10	Relación de la expresión de los genes CpHsf1 con la fuga de electrolitos en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en <i>Carica papaya</i> L.....	124
4.4.11	Relación de la expresión de los genes CpHsf1 y la tasa fotosintética en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en <i>Carica papaya</i> L.	129
4.4.12	Relación de la expresión de los genes CpHsf1 y el índice de rendimiento cuántico del PSII en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en <i>Carica papaya</i> L.....	134

4.4.13	Relación entre los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en <i>Carica papaya</i> L.	139
4.5	DISCUSIÓN	144
4.5.1	Efectos sobre la morfología de <i>Carica papaya</i> L. en respuesta a estrés hídrico y térmico	144
4.5.2	El potencial hídrico de las hojas de papaya Silvestre es menor que el de las plantas del cv. Maradol en condiciones de estrés hídrico y térmico	146
4.5.3	Efectos de altas temperaturas y estrés hídrico en plantas de papaya sobre el fotosistema II	149
4.5.4	Daño en la membrana por altas temperaturas y déficit hídrico	154
4.5.5	Intercambio de gases en respuesta a estrés termico e hídrico	155
4.5.6	CpHsfA2 probablemente orquesta la red transcripcional en <i>Carica papaya</i> L. en respuesta a choque térmico y estrés combinado.	162
4.5.7	CpHsfB3 actua con CpHsfA1d para regular la respuesta a estrés hídrico de <i>Carica papaya</i> L.	166
4.5.8	Relación de la expresión de los genes CpHsfs con la fuga de electrolitos como mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre en <i>Carica papaya</i> L.	169
4.5.9	Relación de la expresión de los genes CpHsfs y la tasa fotosintética como mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre en <i>Carica papaya</i> L.	170
4.5.10	Relación de la expresión de los genes CpHsfs y el índice de rendimiento cuántico del PSII como mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre en <i>Carica papaya</i> L.	172
4.5.11	Relación entre los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado	173
4.6	CONCLUSIONES	175
CAPÍTULO V INTEGRACIÓN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES		183
5	DISCUSIÓN GENERAL	183
5.1	Los genes HSFs como mecanismo de tolerancia a estrés hídrico, térmico y la combinación de ambos en <i>Carica papaya</i> L.	183
5.2	CONCLUSIONES GENERALES	193
5.3	PERSPECTIVAS	196
5.4	LITERATURA CONSULTADA	197

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
C_i	CO ₂ Intercelular
C_s	Sección transversal excitada
C_t	Ciclo de umbral
DBD	Dominio de unión al DNA
E	Transpiración
F_v/F_m	Relación entre la fluorescencia variable (F _v =F _m -F ₀) y F _m .
g_s	Conductancia estomática
HSFs	Factores de transcripción de choque térmico
HSP	Proteínas de choque térmico
ms	Milisegundos
μs	Microsegundos
OEC	Complejo de liberación de oxígeno
P680	Centro de reacción excitado PSII
PC	Plastocianina
Pheo	Feofitina
PI_{abs}	Índice de rendimiento cuántico máximo
P_n	Fotosíntesis
PQ	Plastoquinona libre
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
QA	Quinona primaria

QB	Plastoquinona B
RC	Centro de reacción
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
Ψ_H	Potencial hídrico
μg	Microgramo
μL	Microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Percepción de las células eucariotas a un cambio en la temperatura ambiental y activación de HSF.....	12
Figura 1.2 Estructura de familia de genes HSF de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
Figura 1.3 Plantas de <i>Carica papaya</i> L. de acuerdo con su tipo sexual. Hembra, Hermafrodita, Macho, Planta frutal masculina.....	19
Figura 1.4 Producción mundial de Papaya en porcentajes. Promedio 2015-2017.....	23
Figura 1.5 Principales países productores de Papaya a nivel mundial. Promedio 2015-2017.....	23
Figura 1.6 Estrategia de trabajo de tesis “CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA POR ESTRÉS ABIÓTICO Y LA PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HSF EN <i>Carica papaya</i> L.....	28
Figura 2.1 Identificación de dominios característicos de secuencias proteicas de choque térmico en <i>Carica papaya</i> L. (CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB2b, CpHsfB1, CpHsfB3 y CpHsfC1)	43
Figura 2.2 Árbol filogenético entre secuencias de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Carica papaya</i> L. por método de máxima verosimilitud.....	45
Figura 2.3 Árbol filogenético de genes expresados diferencialmente en respuesta a sequía en <i>Carica papaya</i> L. por método de máxima verosimilitud.....	46
Figura 2.4 Comparación de las estructuras proteicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con respecto a sus secuencias ortólogas en <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp y <i>Carica papaya</i> L. de las subclases CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1.....	48
Figura 3.1 Plantas de <i>C. papaya</i> expuestas a diferentes tiempos de estrés hídrico en plantas de cinco meses de edad de la línea tipo C7 de <i>Carica papaya</i> L.	64

Figura 3.2 Potencial hídrico de la línea tipo C7 de <i>Carica papaya</i> L. en respuesta a déficit hídrico (0, 7, 14, 21 d) sin riego, y un tiempo de recuperación 7 días (28 d)	65
Figura 3.3 Fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) en plantas de tipo C7 de <i>Carica papaya</i> L. expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (0, 7, 14, 21 d), y un tratamiento de recuperación, 7 días (28 d)	66
Figura 3.4 Intercambio de gases de la línea de plantas de tipo C7 de <i>Carica papaya</i> L. expuestas a diferentes tratamientos de estrés por déficit hídrico (0, 7, 14, 21 d), y un tratamiento de recuperación: 7 días (28 d)	68
Figura 3.5 Unidades ribosomales (28S y 18S) de RNA extraído de tejido hoja de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L.	72
Figura 3.6 Se observa la amplificación de los genes CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfB3.y CpHsfC1, en hojas de plantas en estrés de 14 días de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol.....	73
Figura 3.7 Expresión de 9 genes en tejido de hojas de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L.....	77
Figura 4.1 Efecto en <i>C. papaya</i> del estrés por déficit hídrico y alta temperatura, comparativo en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol (M) y silvestre (S). Control: Plantas en condiciones control de riego y temperatura.	96
Figura 4.2 Número de hojas y efecto de estrés por déficit hídrico en las hojas de una planta de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y silvestre.....	97
Figura 4.3 Potencial hídrico y Contenido Relativo de Agua (CRA), de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h), sequía (SQ) y choque térmico más sequía (50 °C/2 h+SQ)	100
Figura 4.4 Fluorescencia de clorofila e Índice de rendimiento PI _{abs} de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico, sequía y choque térmico más sequía.....	103

Figura 4.5 Representación cinética de los transitorios de fluorescencia (OJIP) de hojas de plantas de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés abiótico.....	107
Figura 4.6 Fuga de electrolitos de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h), sequía (SQ) y choque térmico más sequía (SQ +50 °C/2 h)	109
Figura 4.7 Intercambio de gases (Pn, g _s , E y Ci) de dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h), sequía (SQ), choque térmico más sequía (SQ+50 °C/2 h)	113
Figura 4.8 Unidades ribosomales (28S, 18S y 5S) de RNA extraído de tejido de hoja de plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre.....	117
Figura 4.9 Curva estándar y Curva Melt, los valores de Ct se muestran en los cuatros rojos de las 5 diluciones del DNA, cada punto con sus correspondientes tres réplicas en muestras de hojas del genotipo Silvestre, tiempo de estrés 14 días.....	119
Figura 4.10 Niveles de expresión relativa de los genes HSF en papaya: CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3, en respuesta a estrés abiótico en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre.....	123
Figura 4.11 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y la fuga de electrolitos en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h)	126
Figura 4.12 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y la fuga de electrolitos en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego)	127
Figura 4.13 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y la fuga de electrolitos en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h)	128
Figura 4.14 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y fotosíntesis en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h)	131

Figura 4.15 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y fotosíntesis en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego)	132
Figura 4.16 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y fotosíntesis en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h)	133
Figura 4.17 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h)	136
Figura 4.18 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego)	137
Figura 4.19 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h)	138
Figura 4.20 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés térmico (50 °C/2 h)	141
Figura 4.21 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego)	142
Figura 4.22 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs en dos genotipos de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h)	143

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Revisión de la literatura de genes HSF reportados en respuesta a estrés hídrico y altas temperaturas en diferentes especies.....	16
Cuadro 1.2 Clasificación Taxonómica de <i>Carica papaya</i> L.....	18
Cuadro 1.3 Principales entidades productoras de papaya a nivel nacional	24
Cuadro 2.1 Matriz de distancia entre las secuencias HSF de <i>Carica papaya</i> L. cv. SunUp y secuencias de un transcriptoma previo en respuesta a déficit hídrico....	34
Cuadro 2.2 Análisis in silico de la localización subcelular de proteínas de choque térmico basado en porcentaje de identidad en <i>Carica papaya</i> L.....	50
Cuadro 3.1 Calidad y rendimiento ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$) de RNA extraído de tejido de hojas de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. expuestas a diferentes tiempos de estrés por déficit hídrico.....	71
Cuadro 3.2 Diseño y análisis de resultados de la visualización de la banda correspondiente a la expresión de los genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3.y CpHsfC1.....	74
Cuadro 4.1 Cuantificación de RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído de tejido de hojas de plantas jóvenes de <i>Carica papaya</i> L. cv. Maradol y Silvestre expuesta a estrés abiótico (sequía y choque térmico)	116

RESUMEN

El estrés abiótico puede ocasionar numerosos efectos poco favorables que conllevan a una reducción en el rendimiento de los cultivos de hasta 70%. Para hacer frente a esta problemática es necesario estudiar la respuesta al estrés abiótico, a nivel fisiológico y molecular, en plantas adaptadas a ambientes secos y cálidos (silvestres), de interés comercial (maradol) y la línea C7, para identificar genes que estén involucrados en el mantenimiento de la homeostasis celular.

Para ello, se midieron parámetros fisiológicos para caracterizar el grado de estrés de tres tratamientos en respuesta a estrés abiótico; déficit hídrico (SQ), choque térmico (50 °C/2 h), y un estrés similar a lo que ocurre en campo; la combinación de sequía más choque térmico (SQ+50 °C/2 h), con sus respectivos tiempos de recuperación (168 h). Se analizó *in silico* la familia de factores de transcripción de choque térmico para aislar las secuencias de 8 genes candidatos para analizar la expresión por un método cualitativo, de los cuales se seleccionaron 3 genes prometedores para evaluar su expresión por el método de PCR cuantitativo.

Se detectó que las plantas de *Carica papaya* L. tienen mecanismos diferentes para lidiar con 50 °C/2 h y SQ, en el caso de SQ+50 °C/2 h, los mecanismos de respuesta son similares a SQ. Las plantas silvestres mostraron mayor tolerancia a los tres tipos de estrés, por lo que su capacidad de recuperación fue más evidente. La respuesta fisiológica fue acompañada por la especificidad en los niveles de expresión de genes HSF en los diversos tratamientos de estrés, por ejemplo, el gen CpHsfB3 parece ser específico a la respuesta a SQ, mientras que el gen CpHsfA2 parece ser más específico a 50 °C/2 h y SQ+50 °C/2 h, aunque el resto de los genes también participan en la vía de respuesta en *Carica papaya* L.

Demostramos que los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 responden a SQ y que parecen estar involucrados en mantenimiento de la integridad de la membrana celular y el aparato fotosintético, jugando un rol importante en la tolerancia a estrés en las plantas silvestres. Lo anterior sugiere que los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 juegan un papel preponderante en la regulación maestra en la respuesta a 50 °C/2 h y SQ. De manera que se propone la clonación de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 y confirmar su papel en la tolerancia mediante los análisis funcionales, como base hacia la mejora de la tolerancia a altas temperaturas y a la sequía en *Carica papaya* L.

ABSTRACT

Abiotic stress can cause numerous unfavorable effects that lead to a reduction in crop yield of up to 70%. To face this problem, it is necessary to study the response to abiotic stress, at a physiological and molecular level, in plants adapted to drought and heat (wild papayas), and commercially interesting cultivars (Maradol) and the C7 line, to identify genes that are involved in the maintenance of cellular homeostasis.

For this, physiological parameters were measured to characterize the stress status of the three genotypes in response to abiotic stress; water deficit (SQ), heat shock (50 °C/2h), and the combination of both (stress similar to what occurs in the field); drought plus heat shock (SQ + 50 °C/2 h) with their respective recovery times (168 h). The entire family of heat shock transcription factors was analyzed *in silico*, to isolate the sequences of 8 candidate genes to analyze the expression by qualitative RT PCR, from these data 3 promising genes were selected to be further evaluated by quantitative qRT PCR.

It was detected that *Carica papaya* L. plants have different mechanisms to deal with heat stress and water stress. In the case of combined stress, the response mechanisms were more similar to those of water stress. Also, wild plants showed greater tolerance to all three types of stress, so their resilience was more evident. The physiological response was accompanied by the specificity in the expression levels of HSF genes in the various stress treatments, for instance, CpHsfB3 gene seems to be more specific to the response to water deficit, while CpHsfA2 gene seems to be more specific to heat shock and combined stress, although the rest of genes also participate in the response pathway to those abiotic stresses in *Carica papaya* L.

We showed that CpHsfA1d, CpHsfA2 and CpHsfB3 genes responded to water deficit and that they were involved in maintenance of cell membrane integrity and the photosynthetic apparatus, thus playing an important role in stress tolerance in wild plants. Therefore, these results may suggest that the transcription factors, CpHsfA2 and CpHsfB3 play a major role as master regulators in the response to heat shock and water deficit. In such a way, that CpHsfA2 and CpHsfB3 genes are suggested as candidate genes to be further evaluated by functional analysis, as the basis for improving tolerance to heat and drought, in this important tropical species (*Carica papaya* L.).

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DE ESTRÉS ABIÓTICO Y LA PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HSF EN *Carica papaya* L.

1.1 INTRODUCCIÓN

Entre las frutas de gran interés a nivel mundial está *Carica papaya* L., por ser considerada la tercera fruta tropical más consumida en el mundo (Granados *et al.*, 2015). Actualmente, ocupa el primer lugar en puntajes nutricionales, debido al contenido de vitamina A, vitamina B y vitamina C, potasio, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, hierro, calcio y fibra; por lo que su ingesta diaria es altamente recomendable. Además, los tallos, las hojas, las raíces y las semillas de la papaya se utilizan en una amplia gama de aplicaciones médicas y las proteinasas obtenidas del látex lechoso extraído de frutas inmaduras son ampliamente utilizadas en la industria cárnica, cervecera, cosmética y farmacéutica (Chávez y Núñez, 2017; SIAP, 2017).

Aunque se desconoce el lugar exacto de origen, los autores, Antunes y Renner (2012), en la filogenia de todas las especies de la familia Caricaceae, encontraron que *Carica papaya*, *Jarilla chocola*, *J. heterophylla*, y *Horovitzia cnidoscoloides*, forman parte de un clado limitado a México y Guatemala, esta distribución concuerda con la ocurrencia y domesticación de papayas silvestres en América central (Fuentes y Santamaría, 2014).

En este sentido, por su dinamismo y su amplia distribución, su producción se ha extendido a la mayor parte a las regiones tropicales y subtropicales del mundo (SENASICA, 2017).

A nivel mundial, el continente asiático aporta 7.3 millones de toneladas de papaya (que representa el 56.3% de la producción mundial) seguido por el continente americano con 4.2 millones de toneladas anuales (representando el 33.1% de la producción mundial).

Para ser más específicos después de India y Brasil, el mayor productor de papaya en el mundo es México, con 961,768 toneladas al año (FAOSTAT, 2018). De igual forma, México es el líder mundial en la exportación de papaya, el 99.8% de las exportaciones del fruto tiene como principal destino Estados Unidos (SIAP, 2017). Por lo tanto, *Carica papaya* L. se convierte en un cultivar muy atractivo para los agricultores por la alta rentabilidad que proporciona y al período corto que tiene entre la siembra y cosecha (Plan Estatal de Desarrollo, 2018).

Por otro lado, la actividad agrícola demanda el uso de agua dulce y representa alrededor del 70% de las extracciones de los recursos hídricos a nivel mundial (Morison *et al.*, 2008). Particularmente, Rodell *et al.* (2018), a través de estudios satelitales, reporta, que casi dos tercios de los hábitats acuáticos terrestres están siendo cada vez más amenazados, mientras que las precipitaciones y la descarga de los ríos que los sustentan son cada vez más variables, una situación que solo se verá exacerbada por el cambio climático, el crecimiento de la población y las actividades humanas.

De este modo, se estima que en los próximos años la interacción de la sequía con una ola de calor aumente (IPCC, 2014), esto conducen a un impacto negativo significativamente mayor en el crecimiento y la productividad de muchos cultivos comerciales, que cada uno de los estreses abióticos individuales, en especial en el cultivo de papaya, debido que el agua y las condiciones óptimas de temperatura es fundamental en todas sus etapas de crecimiento, principalmente en el llenado del fruto y en la maduración, ya que constituye el 90% de agua (Paull, 1995).

Sin embargo, las especies silvestres relacionadas con los cultivares actuales, han evolucionado a lo largo de muchos años, para soportar las condiciones ambientales adversas, con una variedad de adaptaciones morfológicas, fisiológicas, moleculares y bioquímicas. En este contexto, en nuestro equipo de trabajo se han estudiado las poblaciones nativas de papayas silvestres que se distribuyen en regiones áridas y semiáridas del estado de Yucatán, y genotipos comerciales de tipo Maradol. En estos estudios se ha demostrado que los genotipos silvestres son más tolerantes a la sequía y choque térmico que el genotipo comercial (Romero, 2018; Girón, 2015; Alcocer, 2013), esto a través del estudio de las plantas de papaya y sus respuestas fisiológicas y moleculares a diferentes tipos de estrés abiótico que han conducido al conocimiento de mecanismos de respuesta como: sequía de escape, mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes, para propiciar la tolerancia a la sequía a través de rasgos adaptativos, acumulación de ceras epicuticulares, mantenimiento de la turgencia celular a través del ajuste osmótico, entre otros mecanismos.

De acuerdo con lo anterior, se requieren nuevos enfoques para investigar la respuesta de las plantas a una combinación de estrés abiótico, para mejorar las posibilidades de desarrollar cultivos con mayor tolerancia a condiciones de campo. Se ha demostrado que el centrarse en proteínas tales como los factores de transcripción conducen a un mejor entendimiento sobre rendimiento bajo sequía al uso eficiente del agua (agua transpirada

por molécula de bióxido de carbono asimilado) y a altas temperaturas, sin embargo, poco se sabe de factores de transcripción que respondan a una combinación de estrés hídrico y térmico. Por mencionar, algunos factores de transcripción que han manifestado un papel en la mejora del uso eficiente del agua son miembros que pertenecen a las familias: MYB, MYC, DREB/ CBF, ABF/ AREB, NAC y WRKY, bZIP y AP2/ERF (Singh *et al.*, 2002; Estrella *et al.*, en proceso).

Sin embargo, es interesante estudiar la familia de factores de transcripción de choque térmico (HSF) por su rápida reprogramación en la expresión genética, por su participación en el crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente, por su mecanismo de protección, esencial para el mantenimiento y/o restauración de la homeostasis de proteínas en condiciones adversas, así mismo, esclarecer los complejos mecanismos que tienen las plantas para enfrentar el estrés biótico y abiótico. Debido a la importancia de esta familia de genes, se ha estudiado hasta ahora su implicación en respuesta a sequía y altas temperaturas en los siguientes cultivos: *Arabidopsis thaliana*, la sobreexpresión del gen AtHsfA1b toleró la sequía y la resistencia basal a dos patógenos (Bechtold *et al.*, 2013). En una accesión de *Sesamun indicum* L., considerada tolerante LC164, el gen SiHsfB3 fue el más expresado en respuesta a estrés por déficit hídrico que la accesión hb168 susceptible a sequía (Dossa *et al.*, 2016). En *Solanum lycopersicum* el gen SIHsfA1 resultó ser regulador maestro en respuesta a choque térmico (Mishra *et al.*, 2002). En cuanto a *Carica papaya* L. un análisis transcriptómico de dos genotipos (Maradol y Silvestre) en respuesta a déficit hídrico, mostró la expresión de un número importante de genes de factores de transcripción (TF), en ambos genotipos, entre ellos, miembros de la familia HSF (Estrella *et al.*, 2019).

En la presente tesis se diseñaron experimentos para evaluar la hipótesis de que, la familia HSF podrían desempeñar un papel directo en la respuesta a sequía independiente del choque térmico. Alternativamente, mostrar que la respuesta a ambos tipos de estrés es similar. Además, definir si los genes HSF están involucrados en los mecanismos de tolerancia del genotipo silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico, y/o a choque térmico, o a ambos tipos de estrés.

Hasta el momento la comprensión del papel y la función de algunos miembros de la familia de transcripción HSF es incompleta en *Carica papaya*. Por ello, este trabajo también pretende entender el efecto sobre la fisiología de *Carica papaya* L. de la exposición a estrés hídrico, térmico y estrés combinado, para comprender como participan los factores

de transcripción HSF en dichos estreses. Este trabajo debe ayudar en la selección de genes candidatos con perspectiva de mejoramiento genético de esta importante especie tropical.

1.2. ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1. Estrés abiótico en plantas

El rápido calentamiento global, resultado de la creciente acumulación de gases de efecto invernadero, amenaza con el aumento de temperatura y una disminución en el abastecimiento de agua, situación que afecta diariamente, por lo que la producción mundial de alimentos está limitada por el estrés abiótico (Pandey *et al.*, 2017). Se define el estrés abiótico como el impacto negativo de los factores no vivos en los organismos vivos en un entorno específico (Acevedo y Fereres., 1993). Incluyendo dentro de los factores abióticos a la salinidad del suelo, la sequía y condiciones de temperatura extrema (frio o calor) causales primordialmente de la reducción de todos los procesos fisiológicos en las plantas. Sin embargo, se considera que el estrés por sequía es el principal factor ambiental que pueden conducir a una reducción en la calidad y productividad de los cultivos. Se estima que este tipo de estrés ocasiona una reducción del 70% en comparación con el obtenido en condiciones favorables (Lambers *et al.*, 2008). En este sentido, el estrés por sequía, la salinidad o el calor han sido objeto de una intensa investigación. Sin embargo, en el campo, los cultivos están expuestos a una combinación de diferentes problemas ambientales, como el calor o la salinidad y cada combinación de dos o más estreses diferentes pueden presentar una respuesta que también sea única, pues se descubrió que diferentes genes de la red de genes de *Arabidopsis thaliana* responden de manera diferente a tratamientos de estrés, resultado que evidencia que los genes tienen funciones únicas como parte de diferentes vías de transducción de señales Mittler (2006). Por lo que, la investigación de los mecanismos que confieren la tolerancia a una combinación de diferentes estreses, debería ser el centro de estudios para futuros trabajos de investigación destinados a programas de mejoramiento genético.

1.2.2. Sequía

En las últimas décadas, las actividades antropogénicas han provocado perturbaciones en el clima global, induciendo pérdidas irreversibles de biodiversidad, así como problemas socioeconómicos (Sintayehu, 2018). Uno de ellos, es la disponibilidad de agua, que ha disminuido en la mayoría de las áreas tropicales y de latitudes medias y altas, a nivel mundial. De acuerdo, con una predicción realizada por el “Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)” en 2007, se pronostica una reducción del 50% en el rendimiento de los cultivos para el año 2020, y una disminución en los ingresos netos de la cosecha en casi un 90% para 2100. En México, se han tenido pérdidas considerables debido a sequías extremas. En julio del presente año, se reportaron un total de 32 municipios afectados por una fuerte sequía y de acuerdo con los pronósticos realizadas por CONAGUA (2019), las afectaciones en nuestro país irán en incremento afectando la producción de muchos cultivos, tal es el caso que reportó Riffo (2018), debido a la pérdida de un tercio de la producción de *Carica papaya* en la Serena, Chile, debido a altas temperaturas y déficit hídrico.

El estrés hídrico en cualquier etapa de crecimiento tiene efectos adversos e irreversibles en el crecimiento y desarrollo de los cultivos, pero varía de acuerdo con la gravedad del estrés, el tiempo de exposición y la etapa de crecimiento de los cultivos. Las plantas expuestas a déficit hídrico se ven significativamente afectadas en el contenido relativo de agua, potencial hídrico de las hojas, el potencial osmótico, el potencial de presión y la tasa de transpiración provocando disminución en el crecimiento de las plantas afectando varios procesos fisiológicos y bioquímicos, como la fotosíntesis, la respiración, la translocación, la absorción de iones, los carbohidratos, el metabolismo de nutrientes, cierre de estomas conduce a la limitación del intercambio de gases y los promotores del crecimiento (Jaleel *et al.*, 2009). A nivel morfológico, alargamiento del tallo, desarrollo del sistema radical para aumentar la absorción de agua, reducción en la absorción de nutrientes y transporte de los mismos (Wasaya *et al.*, 2018). Así mismo, se percibe que el estrés hídrico conduce a un estrés secundario con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno que son altamente tóxicas y causan severos daños a proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. En el peor de los casos el estrés hídrico severo puede provocar una reducción en la fotosíntesis debido a una disminución en las actividades de ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCase), enzima málico NADP (NADP-ME), fructosa-1, 6-bisfosfatasa

(FBPase) y piruvato ortofosfato dikinasa (PPDK), la alteración del metabolismo y finalmente la muerte de la planta (Kijne, 2006).

Sin embargo, algunas plantas pueden sobrevivir a eventos adversos mediante mecanismos adaptativos morfológicos y bioquímicos a nivel celular clasificados como: escape al déficit hídrico, evasión de la deshidratación y tolerancia al déficit hídrico (Farooq *et al.*, 2012).

- **Escape al déficit hídrico:** es un mecanismo de adaptación notable que implica un rápido desarrollo de la planta para permitir la finalización del ciclo de vida completo antes de un evento de sequía (Shavrukov *et al.*, 2017).
- **Evasión de la deshidratación:** este mecanismo tiene como finalidad minimizar la pérdida de agua por transpiración al mantener un alto potencial hídrico de las hojas o un alto contenido relativo de agua durante el estrés, evitando así la deshidratación de los tejidos. Las plantas logran este mecanismo a través de cambios morfológicos como biomasa reducida, proliferación de raíces, enrollamiento de hojas, estomas más pequeños y área foliar más pequeña (Kadioglu y Terzi, 2007).
- **Tolerancia al déficit hídrico:** Es la capacidad de las plantas para tolerar el déficit de agua aún con potenciales hídricos bajos y está determinada por múltiples vías bioquímicas que facilitan la retención y adquisición de agua, protegen las funciones del cloroplasto y mantienen la homeostasis de los iones (Bohnert y Jensen, 1996).

1.2.3. Temperaturas Extremas

Uno de los estreses más comunes que enfrentan las plantas son las bajas y altas temperaturas. En términos de respuesta, las plantas presentan una gran variación entre especies para tolerar dichos cambios, por ejemplo, *Nicotiana rustica* tolera a una temperatura de 49-51 °C durante 10 minutos, en cambio *Citrus aurantium* tolera una temperatura de 50.5 °C por 15-30 minutos (Taiz y Zeiger, 2003), *Carica papaya* L., por su parte tolera una exposición a 40 °C durante 4 horas (Okunlola y Adelusi, 2013). De acuerdo con la termotolerancia, las especies de plantas se clasifican en tres grupos: psicrófilos: que crecen óptimamente a rangos de baja temperatura entre 0 y 10 °C; Mesófilos: crecen bien entre 10 y 30 °C y Terofilos: que crecen bien entre 30 y 65 °C o incluso más (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Cuando la temperatura excede el límite óptimo para una especie determinada, interrumpe procesos metabólicos y biológicos. A nivel celular, los daños en el citoesqueleto, fragmentación y desmonte de los orgánulos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, disminución e integridad de las mitocondrias y los lisosomas, cambios en la morfología de la membrana, consecuente al estrés por altas temperaturas llevan a frenar el crecimiento de la planta y conducen a la detención del ciclo celular (Richter *et al.*, 2010).

Dentro de los síntomas morfológicos del estrés por calor, se incluyen quemaduras solares en hojas, ramas y tallos, senescencia y abscisión de hojas, inhibición del crecimiento de brotes y raíces, decoloración y daño de la fruta (Hatfield y Prueger, 2015; Howarth, 2005). A nivel fisiológico, la temperatura puede afectar la fotosíntesis a través de la modulación de las tasas de actividad de las enzimas fotosintéticas y la cadena de transporte de electrones (Lloyd, 2008). Así mismo, el potencial hídrico de la hoja y el intercambio de gases disminuye, la pérdida de turgencia y la fuga de electrolitos aumenta (Prasad *et al.*, 2008). A nivel molecular, el estrés por calor provoca cambios en la expresión de genes implicados en la protección directa. Es decir, las plantas reconocen el estrés ambiental mediante vías de señalización, estas vías activan genes responsables de la expresión de osmoprotectores, enzimas desintoxicantes, transportadores y proteínas reguladoras que conducen a ajustes en el metabolismo, desarrollo de las plantas y/o mantenimiento de la membrana (Nievola *et al.*, 2017).

1.2.4. Sequía y altas temperaturas

A menudo la sinergia de dos estreses no es usualmente reportada en la literatura científica, por lo que los efectos combinados sobre la fisiología de las plantas requieren mayor atención. En este sentido, un estudio realizado por Mittler (2006), demuestra que la caracterización fisiológica de las plantas sometidas a una combinación de estrés por sequía y estrés por calor tiene varios aspectos únicos, por ejemplo, las plantas en respuesta a altas temperaturas abren sus estomas para enfriar sus hojas por transpiración. Sin embargo, si el estrés por calor se combina con la sequía, las plantas no abrirían sus estomas, esto para evitar pérdida de agua, lo que conllevará a un aumento en la temperatura de sus hojas. Por lo tanto, se sugiere que estos estreses causan daños severos, cuando se combinan, en comparación con el factor de estrés individual. Otros de los daños que presentan la unión de dos estreses, se pueden resumir en la reducción del contenido de clorofila, niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, que conlleva al daño a las proteínas, lípidos y DNA, lo que finalmente resulta en estrés oxidativo. La tasa fotosintética, la conductancia estomática y el crecimiento de las plantas se reducen en mayor grado que la sequía o el calor aplicado individualmente (Suzuki *et al.*, 2014). Sin embargo, los efectos de las plantas a la respuesta al calor y la sequía dependen de la intensidad y frecuencia de estrés, y de factores específicos de la planta, como la etapa de desarrollo y el potencial de adaptación de la especie (Gray y Brady, 2016).

Uno de los retos es elucidar las diferentes vías de señalización desencadenadas en las plantas durante la combinación de estrés, el análisis de transcriptoma de las plantas sometidas a la combinación de sequía y calor concuerdan con los daños fisiológicos y metabólicos de esta combinación de estrés involucran alrededor de 454 transcriptos que se elevaron específicamente por la combinación de estos estreses en *Arabidopsis thaliana* (Rizhsky *et al.*, 2004). En este sentido, Koussevitzky *et al.* (2008), encontraron que también se encuentran metabolitos y proteínas únicas, al menos 45 proteínas diferentes que se acumulan específicamente durante la combinación de estrés en *Arabidopsis thaliana*. Para la supervivencia de las plantas ante un estrés es importante mantener las proteínas en sus conformaciones funcionales y evitar la agregación de proteínas no nativas actuando como moléculas protectoras o señales regulatorias para el mantenimiento de la homeostasis celular. Las proteínas de choque térmico son moléculas chaperonas, producidas en respuesta a un aumento de temperatura u otro estrés, son responsables

del plegamiento, ensamblaje, translocación y degradación de proteínas en muchos procesos celulares normales, estabilizan proteínas y membranas, y pueden ayudar al replegamiento de proteínas en condiciones adversas. Sin embargo, existen otras chaperonas que están involucradas en la homeostasis; las proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA) y las proteínas inducidas por la deshidratación (deshidrininas). Las deshidrininas se han expresado más durante la sequía, el calor y por un mayor contenido de ABA, incluso se han propuesto como marcadores moleculares al estrés abiótico de plantas (Priya *et al.*, 2019). Mientras que las proteínas LEA están involucradas especialmente en la protección por el estrés a déficit hídrico, pero también desempeñan funciones en la tolerancia al estrés salino y el frío (Hong *et al.*, 2005). Por último, la osmotina es una proteína rica en cisteína, desempeña un papel importante como antifúngico contra una amplia gama de hongos, además protege las membranas plasmáticas de las plantas en potenciales hídricos menores (Hakim *et al.*, 2018). Sin embargo, las chaperonas más importantes pertenecen a la familia HSP (*Heat Shock Proteins*) involucradas en la protección a estrés por sequía y el 75% de ellas, protegen de la desnaturalización por calor (Pereyra y Quiriban, 2014).

1.2.5. Factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico

Los factores de transcripción son reguladores principales de la protección directa de la célula en respuestas a estrés abiótico y biótico en plantas. A nivel genómico, aproximadamente el 7% de las secuencias codificantes se asignan a factores de transcripción clasificadas con fundamento en su dominio de unión al DNA (Inukai *et al.*, 2017). Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* dedica aproximadamente el 5% de su genoma a codificar más de 1500 factores de transcripción, agrupadas en 58 familias (Riechmann *et al.*, 2000).

En este sentido, se definen a los factores de transcripción como, proteínas capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de DNA localizadas en los promotores de genes, y de interactuar con el complejo de pre-iniciación de la transcripción para inducir o reprimir la actividad de la enzima RNA polimerasa II (García *et al.*, 2013). De esta manera, los factores de transcripción modulan la tasa de transcripción de sus genes blanco a través de un sistema denominado regulón; existen dos tipos, uno dependiente de ABA y otro independiente de ABA (Nakashima *et al.*, 2009). Además, de estas dos vías principales, otros regulones incluidos como NAC y MYB/MYC participan en la respuesta a estrés abiótico y su expresión está basada en genes específicos divididos en tres categorías principales (i) los que están implicados en las cascadas de señalización y en el control transcripcional, tales como MyC, MAP kinasas y SOS kinasas, fosfolipasas y factores de transcripción, tales como HSF, y las familias CBF/ DREB Y ABF/ ABAE; (ii) aquellos que funcionan directamente en la protección de membranas y proteínas, como las proteínas de choque térmico (HSPs) y chaperonas, proteínas de embriogénesis tardía abundante (LEA), osmoprotectores y eliminadores de radicales libres; y (iii) los involucrados en la toma y transporte de iones y agua, como los transportadores iónicos y las acuaporinas (Wang *et al.*, 2003).

Sin embargo, cada vez más se ha demostrado que los factores de transcripción que juegan un papel en la mejora del uso eficiente del agua al actuar en el nivel de síntesis proteica pertenecen a la familia WRKY, AP2 / ERF, bZIP, NAC y MYB, y que además están involucrados en la regulación de la defensa de planta y la respuesta a otro tipo de estrés abiótico (Ren *et al.*, 2010; Cominelli *et al.*, 2005). Por ejemplo, los perfiles de expresión génica de trigo indicaron que el gen NAC2, participa en la respuesta al

tratamiento de estrés hídrico, salino, frío y ácido abscísico (Mao *et al.*, 2012). En trigo, el gen TaWRKY10 respondió positivamente al tratamiento con polietilenglicol, salino (NaCl) y frío (Wang *et al.*, 2013).

1.2.6. Factores de transcripción de choque térmico: HSF

Las células y tejidos de las plantas son desafiados constantemente por la exposición a condiciones extremas que causan estrés agudo y crónico. En consecuencia, la supervivencia ha requerido la evolución de genes en respuesta al estrés para detectar, controlar y responder a los cambios ambientales (Jin, 2013). Se ha demostrado que con uno o más genes de choque térmico suele ser suficiente para proteger a las plantas contra exposiciones letales a diversas tensiones medioambientales, caracterizada por la inducción rápida de proteínas que funcionan principalmente como chaperonas moleculares. En eucariotas, las proteínas del choque térmico (HSP), se clasifican en cinco grandes familias (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs pequeñas) de acuerdo con su peso molecular, estructura y función, se definen por su capacidad para reconocer y unir proteínas de sustrato que se encuentran en un estado inestable e inactivo (Ohama *et al.*, 2017; Magnard *et al.*, 1996). Estas proteínas se encuentran de forma constitutiva, y controlada por factores de transcripción de choque térmico (HSFs) que componen los mecanismos terminales de una cadena de transducción de señales que intervienen en la activación de genes, que responden tanto al estrés térmico como a un gran número de factores bióticos y abióticos (Miller y Mittler, 2006).

En general, la regulación de la expresión del gen de choque térmico está mediada por el factor de transcripción de choque térmico y se logra en dos etapas. En ausencia de estrés, HSF se encuentra como un monómero inerte unido a HSP70 y otras proteínas. Al percibir la célula eucariota la señal de estrés a través de: un aumento de calcio citoplásmico, acumulación de especies reactivas de oxígeno y/o el flujo de proteínas no nativas, dará el requerimiento de chaperonas moleculares, incluidas la HSP70 y la HSP90, para prevenir la aparición de proteínas mal plegadas y desnaturalización. Chaperonas unidas a HSF serán secuestradas por proteínas celulares dañadas, y en consecuencia de la liberación de chaperonas el HSF se convierte de una forma monomérica a una forma trimérica para translocar del citoplasma al núcleo y unirse a elementos de unión al DNA, llamado elemento de respuesta al choque térmico (HSE; 5'-

AGAAnnTTCT-3') (Figura 1.1), compuesto por tres repeticiones invertidas contiguas de una secuencia de 5 pares de bases cuyo consenso se definió como nGAAn que da como resultado interacciones de mayor afinidad entre HSF y HSE (Guo *et al.*, 2016; Santoro, 2000; Wu, 1995). Sin embargo, la diversificación entre las plantas *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Triticum* con 21, 23 y 56 genes de tipo HSF respectivamente, reflejan que estos genes son importantes para diversas funciones celulares y probablemente se volvieron cada vez más insistentes, es decir, la activación de la transcripción de genes de choque térmico también se modula en condiciones no estresantes durante la progresión a través del ciclo celular, durante el desarrollo y la diferenciación, o después de la exposición a moléculas que regulan la proliferación celular (Von *et al.*, 2007).

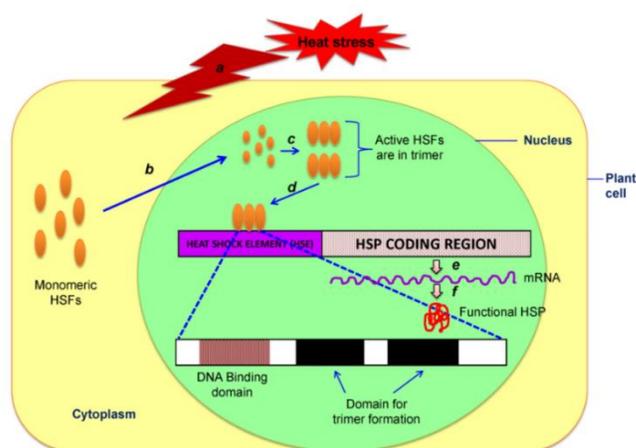


Figura 1.1 Percepción de las células eucariotas a un cambio en la temperatura ambiental y activación de HSF. El flujo de proteínas no nativas da como resultado el requerimiento celular de HSP70 y HSP90, para prevenir la aparición y agregación de proteínas mal plegadas. A) En condiciones normales los HSFs se encuentran como monómeros en el citoplasma, bajo condiciones de estrés se trimerizan y se traslocan al núcleo (b y c), donde se unen a la zona promotora HSE para iniciar la transcripción de genes HSFs (d). (Hasanuzzaman *et al.*, 2013)

1.2.7. Identificación y estructura de la familia HSF

Los HSFs tienen una estructura modular, conservada, se han clasificado en tres clases diferentes (A, B y C) de acuerdo con sus estructuras características únicas (Wang *et al.*, 2016). Las proteínas HSF de clase A poseen el motivo peptídico AHA, caracterizado por residuos de aminoácidos aromáticos (W, F, Y) hidrofóbicos (L, I, V) y ácidos (E, D), motivo involucrado en la actividad transcripcional, en *Arabidopsis thaliana* es el grupo más grande de HSFs con 15 proteínas (Von *et al.*, 2007). Los HSF de la clase B y C al carecer del motivo de activación hidrofóbico/ácido (AHA) no tienen actividad regulatoria de sí mismos por lo que pueden ser represores transcripcionales y/o coactivadores al interactuar con genes de HSF de clase A (Scharf *et al.*, 2012; Czarnecka *et al.*, 2004) (Figura 1.2). De acuerdo, a Nover *et al.* (2001), la clase C, con un solo miembro en *Arabidopsis thaliana* no se le ha atribuido ninguna función por lo que el rol funcional de la clase HSFC no ha sido completamente reconocido (Xiang *et al.*, 2013).

Todos los HSFs contienen un dominio de unión a DNA (DBD, DNA Binding Domain), un dominio de oligomerización (OD, Oligomerization Domain), una señal de localización nuclear (NLS) y en la mayoría de los casos una señal de exportación nuclear (NES, Nuclear Export Signal) y un dominio de activación C-terminal (CTAD, C-terminal activation Domain) (Von *et al.*, 2007). El DBD es el dominio más conservado con aproximadamente 100 aminoácidos que exhiben un motivo de tres hélices (H1, H2 y H3) y una hoja beta antiparalela de 4 cadenas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$), que permite el reconocimiento específico y la unión de los HSE palindrómicos (Kotak *et al.*, 2004). Separados por un péptido enlazador flexible de 9 a 39 residuos de aminoácidos para la clase A, 50 a 78 aminoácidos residuos para la clase B, y 14 a 49 residuos de aminoácidos para la clase C, en *Arabidopsis thaliana*, se encuentran dos repeticiones de heptadas hidrófobas adyacentes (HR-A y HR-B) que comprenden el dominio de oligomerización (Nover *et al.*, 2001). Un dominio menos conservado en tamaño y secuencia es el dominio de activación terminal (CTAD), se caracteriza por residuos de aminoácidos aromáticos (W), hidrofóbicos (L) y ácidos (E). Mientras que la señal de localización nuclear (NLS) presenta residuos ricos en Arg (R) y Lys (K) en los HSFs. En la clase B, el motivo tetrapéptido altamente conservado **-LFGV-** presumiblemente sirve como NLS en *Solanum lycopersicum* y se predice como el motivo represor de la transcripción (Duan *et al.*, 2019; Scharf *et al.*, 2012). Mientras que en *Arabidopsis thaliana* el motivo

encargado de la represión transcripcional en el gen AtHsfB1 es **-KLFGV-** (Ikeda *et al.*, 2011). Por último, la señal de exportación nuclear (NES) necesaria para la exportación intracelular entre el núcleo y el citoplasma es caracterizada frecuentemente por residuos ricos en L (leucina) en el extremo C terminal (Scharf *et al.*, 2012).

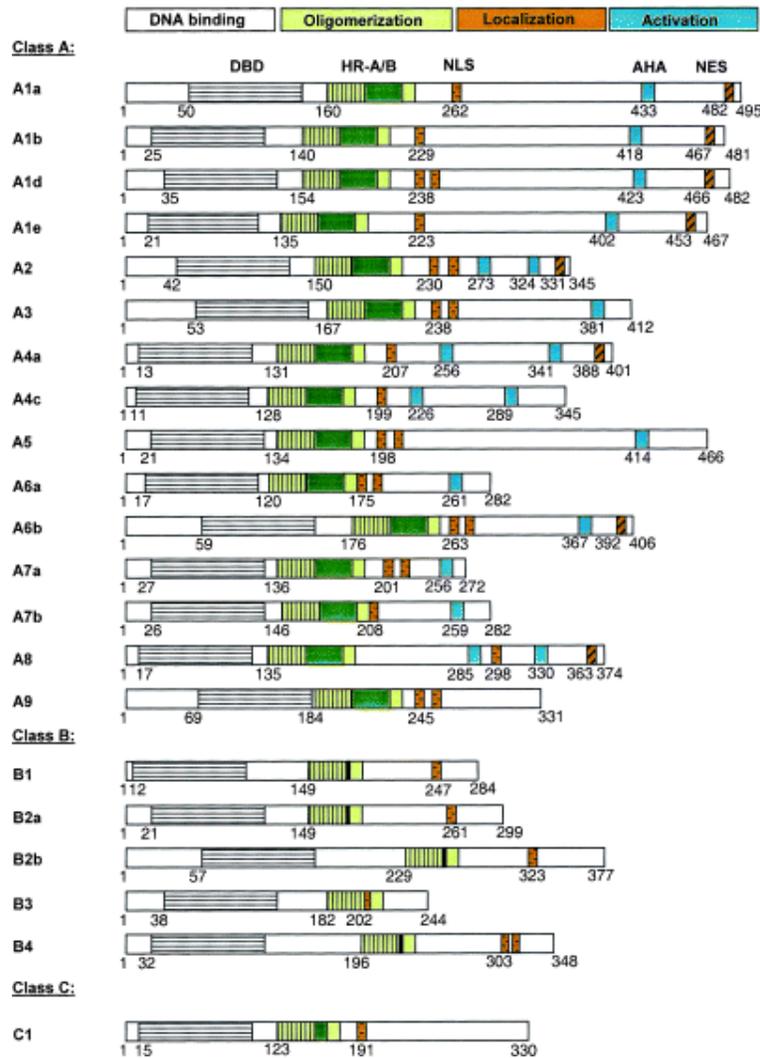


Figura 1.2 Estructura de familia de genes HSF de *Arabidopsis thaliana* (Kotak *et al.*, 2004). Se ejemplifica cada dominio característico las tres clases existentes (Clase A, B y C). DBD: Dominio de unión al DNA, Dominio de oligomerización, HR-A/B: Residuos hidrofóbicos, NLS: Señal de localización nuclear, AHA: aminoácidos aromáticos, hidrófobos grandes y ácidos, NES: señal de exportación nuclear.

1.2.8. Genes HSF involucrados en la tolerancia a estrés hídrico y térmico

Las plantas están continuamente expuestas a diversos estreses ambientales como el estrés por choque térmico, la salinidad, la sequía y el frío. Por lo tanto, han desarrollado mecanismos de defensa para adaptarse a los cambios ambientales. En este sentido, un análisis transcriptómico previo en respuesta a déficit hídrico en *Carica papaya* L, realizado por Estrella *et al.* (2019) encontró la activación de genes HSF, de los cuales, en este trabajo, se seleccionaron para además realizar un análisis de estrés térmico. Con el objetivo de seleccionar un gen candidato que confiera tolerancia a estrés hídrico y térmico.

Se ha evidenciado que la familia de factores de transcripción de choque térmico (HSF) ha evolucionado para regular una diversidad funcional en diferentes condiciones de estrés, en diferentes cultivos. Del mismo modo, muchos genes HSF se inducen en respuesta a tensiones ambientales distintas del calor y/o algunas clases y subclases son determinantes en la tolerancia a sequía, estrés térmico y a estreses combinados (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1 Revisión de la literatura de genes HSF reportados en respuesta a estrés hídrico y altas temperaturas en diferentes especies

HSF	Especie	Respuestas de estrés	Referencias
CpHsfA1a CpHsfA1b CpHsfA2 CpHsfB1 CpHsfB2b CpHsfC1 SiHsfA1a	<i>Carica papaya</i> cv. Maradol	Mayor intensidad de banda del gen CpHsfA2 bajo estrés térmico de 30 °C, 40 °C y 50 °C durante 1 hora.	Alcocer (2013)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Regulador maestro en respuesta a estrés térmico e involucrado en el crecimiento y el desarrollo	Mishra <i>et al.</i> (2002)
AtHsfA1b	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aumento de la tolerancia a sequía.	Bechtold <i>et al.</i> (2013).
AtHsfA1d	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Regulan la expresión de HsfA2	Nishizawa <i>et al.</i> (2011).
AtHsfA2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HsfA2 mostraron una mayor tolerancia a estrés combinado por luz y choque térmico. al estrés salino / osmótico y un mayor crecimiento de callos	Nishizawa <i>et al.</i> (2006). Ogawa <i>et al.</i> (2007).
CpHsfB1	<i>Carica papaya</i> L.	Expresión del gen en hojas sometidas a una temperatura de 42 °C	Tarora <i>et al.</i> (2010).
SiHsfB3	<i>Sesamum indicum</i> L.	Mayor expresión en la accesión LC164 tolerante en respuesta a déficit hídrico	Dossa <i>et al.</i> (2016).
TaHsfC1 Y TaHsfC2	<i>Triticum aestivum</i>	Regulados durante la sequía y el estrés por sal.	Xue <i>et al.</i> (2014).

1.3.1 Origen y distribución de *Carica papaya* L.

Papaya (*Carica papaya* L.) es el fruto número uno en el alto porcentaje de vitamina A, vitamina C, potasio, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, hierro, calcio y fibra (Huerta *et al.*, 2012). Además, es atractivo para industrias médicas debido a las propiedades medicinales de la fruta y de otras partes de la planta como los tallos, las hojas y las raíces, en la elaboración de cosméticos y producción de papaína (Posada *et al.*, 2010). Debido a la gran utilidad e importancia medicinal y como alimento nutracéutico hoy en día es la tercera especie tropical más cultivada en todo el mundo, ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales, el cual se ve favorecido por las condiciones edafoclimáticas para su debido crecimiento y desarrollo (Chávez y Núñez, 2017). Se ha formulado la hipótesis que tiene su origen en el sur de México y/o en América Central, sin embargo, es difícil definir un origen preciso debido a que no hay evidencia arqueológica (Carvalho y Renner, 2014). Se cultiva en forma comercial no sólo en las regiones de América, sino también en África, Asia, Australia, Filipinas y en los Estados Unidos (FAOSTAT, 2018). En México, 21 estados aportan en la producción de papaya, siendo el principal productor Oaxaca, seguido por Colima, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Jalisco, Campeche, Yucatán y Tabasco (SIAP, 2017).

1.3.2 Clasificación taxonómica

Carica papaya L., es una planta herbácea, dicotiledónea, miembro de la familia Caricaceae (Dhekney *et al.*, 2016). Actualmente, la familia se divide en seis géneros, cinco de ellos con alrededor de 35 especies son americanos y un género con dos especies es africano (CONABIO, 2008). De acuerdo con Kim *et al.* (2002), los géneros correspondientes a esta familia son: *Carica*, con la única especie *C. papaya*, *Jarilla*, con 3 especies, *Horovitzia* (1 especie), *Jacaratia* (7 especies), *Vasconcellea* (21 especies) y *Cylicomorpha* (2 especies). En el cuadro 1.2 se presenta la clasificación taxonómica de papaya de acuerdo con el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2018).

Cuadro 1.2 Clasificación Taxonómica de *Carica papaya* L.

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

1.3.3 Descripción morfológica

La papaya es una planta arborescente perennifolia de crecimiento rápido ya que puede iniciar su producción a los 7 u 8 meses de edad y estabilizar su cosecha a los 12 meses después del trasplante, esta puede crecer de 2 a 8 m durante su primer año de vida, puede llegar a medir hasta 10 m (CONABIO, 2008). Crece como árbol de tallo único, aunque puede ramificar cuando se elimina el punto apical o cuando las plantas llegan a la vejez (Fisher, 1980). El tallo es coronado por un grupo de hojas grandes de pecíolo largo, de 0.7 a 1 m de longitud, con una lámina palmeada de 7 a 9 lóbulos. La papaya es una planta trioica, es decir, presenta tres tipos de sexo; masculina, femenina y hermafrodita (Figura 1.3). Sin embargo, se pueden encontrar seis categorías de flores: femenina, hermafrodita pentandria, hermafrodita intermedia, hermafrodita elongata, hermafrodita estéril o “cornetilla”, masculina típica (Vázquez *et al.*, 2010; Gil y Miranda, 2005). Las flores femeninas, de tubo corolino corto, con 3-5 carpelos concrecentes en un ovario unilocular, estilos libres; su estructura permite la fácil polinización por el viento o los insectos (Font, 1965).

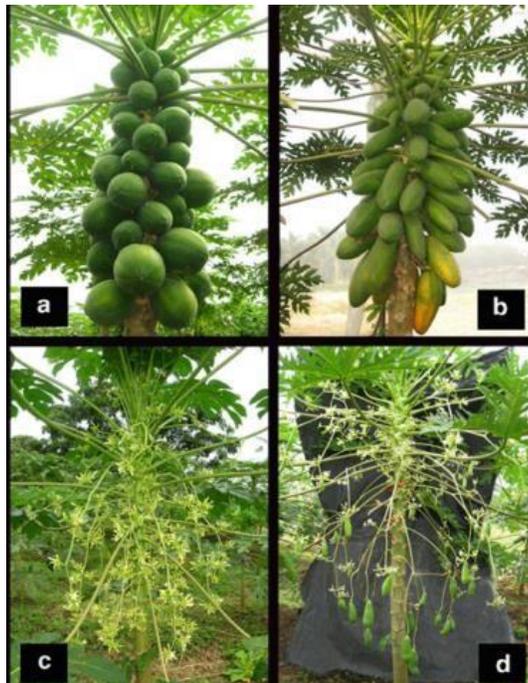


Figura 1.3 Plantas de *Carica papaya* L. de acuerdo con su tipo sexual. a) Hembra, b) Hermafrodita, c) Macho, d) Planta frutal masculina (Jiménez *et al.*, 2014).

Las flores masculinas poseen corola tubular y 10 estambres concrecentes con ella, estas flores raras veces producen frutos los cuales se desprenden prematuramente (Roth y Clausnitzer, 1972). Mientras que la flor hermafrodita pentandria es una modificación del tipo femenino, por lo que se parece a ésta; presenta cinco pétalos con cinco estambres cortos, correspondientes por su ubicación, con los cinco pétalos que también abren desde la base, el ovario tiene cinco surcos profundos longitudinales que deforman al fruto, por lo cual tienen poco valor comercial (Vásquez, 2010). La flor hermafrodita intermedia, presenta cinco pétalos que pueden ser libres o fusionados desde su base hasta la mitad de su longitud, su fruto es de forma ovoide, por lo que esta fruta no tiene valor comercial. Los frutos más comerciales en México y Estados Unidos de América provienen de la flor hermafrodita elongata, casi siempre se presentan en pequeños racimos de dos o tres flores, presenta cinco pétalos unidos entre sí entre una cuarta y tres cuartas partes de su longitud, con diez estambres, cinco largos y cinco cortos. El ovario es alargado, por lo que forma frutos cilíndricos o piriformes. La flor

hermafrodita estéril o cornetilla es parecida a la hermafrodita elongata, pero no desarrolla ovario, por lo cual es estéril; esto debido a temperaturas muy cálidas o por deficiencias de agua en el suelo (García *et al.*, 2010; Gil y Miranda, 2005).

Un fruto de papaya produce entre 300 y 800 semillas de forma ovoide y de color marrón oscuro en la madurez es cubiertas por una capa mucilaginoso (sarcotesta), parda negruzca (endotesta) y arrugada. (CENTA, 2010; CONABIO, 2008). Su tamaño fluctúa entre 3.7 a 4.5 mm de largo por 2 a 2.8 mm de ancho y 2 a 2.5 mm de grueso. El embrión presenta división axial, debido a que se ubica en el eje central de la semilla y subdivisión folial, la forma del embrión es espatulada, ya que los cotiledones son rectos y la radícula no se encuentra cubierto por ellos (Niembro, 1988). Las plantas de papaya poseen un sistema radical pivotante, es una raíz principal que puede desarrollarse hasta un metro de profundidad dependiendo de las condiciones del suelo; mientras que las raíces secundarias se desarrollan en un radio de 80 cm y la mayor concentración de raíces absorbentes se encuentra en los primeros 20 cm (CENTA, 2010).

1.3.4 Requerimientos edafoclimáticos

Los factores naturales influyen de manera decisiva en el desarrollo de todo cultivo. En el caso de *Carica papaya* L., la mayoría de las plantaciones se adapta en los límites de los 32 a 35 grados de latitud norte y de 32 a 35 grados de latitud sur, en las zonas tropicales y subtropicales, lo que corresponde a áreas cálidas que están comprendidas desde el nivel del mar hasta los 1000 m; pero los mejores rendimientos y calidad de frutos se obtienen entre los 0-600 msnm. Estas condiciones son de vital importancia para mantener frutos de buena calidad con alto contenido de azúcares (Storey, 1985).

1.3.5 Temperatura

Carica papaya L. es un cultivo que se puede adaptar a diversas latitudes y condiciones de clima y suelo, pero la temperatura es la principal limitante de producción. Las temperaturas promedio óptimas para el cultivo del papayo se ubican entre 21 y 33 °C con un óptimo para la fotosíntesis entre 25 y 30 °C (Ruiz *et al.*, 2013). A temperaturas inferiores de 15 °C las plantas inhiben el desarrollo de los botones florales y causan abscisión de las flores en especial las variedades con alto porcentaje de flores hermafroditas, como la Hawaiana. Temperaturas menores durante la floración inducen

que los estambres de las flores se fusionen con los carpelos del ovario, provocando frutos deformes (carpeloides), sin valor comercial. Mientras que a 0 °C se presentan fuertes daños al follaje; a -2 °C los frutos se dañan considerablemente y a -4 °C la planta muere (Jiménez, 2002).

1.3.6 Luz

En cuanto a luz, este frutal prefiere áreas soleadas, en especial las papayas silvestres Chavéz (2018); se reporta que crece mejor con cantidades de radiación fotosintéticamente activa entre 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 1650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De lo contrario, la planta reduce su crecimiento, presenta menor área foliar y baja su densidad estomática (Vázquez *et al.*, 2010).

1.3.7 Suelo

Las plantas de papaya se desarrollan en diferentes tipos de suelo siempre que sean suelos ligeros, fértiles (ricos en humus), blandos, profundos y permeables. La permeabilidad es un requisito esencial en el cultivo ya que un drenaje insuficiente puede provocar pudriciones en las raíces, causando clorosis en las hojas, pérdida de vigor e incluso la muerte de la planta. Por otra parte, suelos compactados dificultan el crecimiento de la planta al reducir el volumen de exploración radial (Arango *et al.*, 2000). El suelo óptimo para el cultivo de papaya es un suelo franco poroso o franco arenoso con un contenido medio de 4 a 5% de materia orgánica. El pH óptimo está comprendido entre 5.5 y 6.5, pero puede cultivarse sin problemas hasta un pH de 8.0.

1.3.8 Humedad

A diferencia de otros cultivos frutales, la papaya no requiere un período de descanso para florecer y dar fruto y, por lo tanto, demanda altas cantidades de agua durante todo su ciclo. Además, es un cultivo de raíces poco profundas donde la superficie de la raíz está limitada a los primeros 60 cm del perfil del suelo, por lo que el contenido de agua disponible del suelo debe ser lo suficientemente alto como para retener el agua acumulada al alcance de las raíces (Shijini, 2010). Una falta de ella durante su crecimiento puede ocasionar caída de flores, producción de flores hermafroditas estériles ocasionando reducción de los rendimientos hasta en un 70%. El requerimiento de agua fluctúa entre los 1,500 y 2,500 mm por año y con una humedad relativa entre 70 y 80% esto para mantener una óptima

conductancia estomática y un buen crecimiento del cultivo (La gra, 1993). Dicho lo anterior, la papaya se considera sensible a la sequía, por ello, se recomienda el riego por goteo o microaspersores, el costo por estos sistemas en una hectárea va de \$80 000 a \$100 000 mil (FAO, 2007). El requerimiento de agua es de cada 2 días en la etapa juvenil y cada 6 días en las demás etapas. Para árboles de más de siete meses de edad se requiere $25 \text{ L árbol}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Esto equivale a cinco emisores de goteo por árbol, cada uno entregando un litro por hora durante cinco horas por día (Carr, 2014).

1.4 Producción mundial de papaya

La producción mundial anual de *Carica papaya* L. es de 13, 290, 320 de toneladas, por lo que la papaya es un cultivo de fruta extremadamente importante (FAOSTAT, 2018). En los últimos años, la producción de papaya se ha concentrado en África, América, Asia y Oceanía. La mayor producción se obtuvo en el continente asiático con 7.3 millones de toneladas (que representa el 56.3% de la producción mundial) seguido por el continente americano con 4.2 millones de toneladas anuales (que representa el 33.1% de la producción mundial). El continente africano contribuyó con el 10.5% mientras que Oceanía aportó sólo el 0.1% (Figura 1.4). Después de India y Brasil, el mayor productor de papaya en el mundo es México con 961,768 toneladas al año. Respecto a los principales exportadores a nivel mundial, México es el líder mundial en la exportación de papaya, ocupa el primer lugar con 168.7 toneladas, por un valor de 87 millones de dólares, que representó el 57% de la exportación total a nivel mundial (SENASICA, 2017; SAGARPA, 2016). El consumo de papaya ha cobrado mayor importancia, debido a los altos contenidos nutricionales, las aplicaciones médicas lo que ha propiciado el esparcimiento de su producción en los últimos años y no queda en duda que siga en aumento.

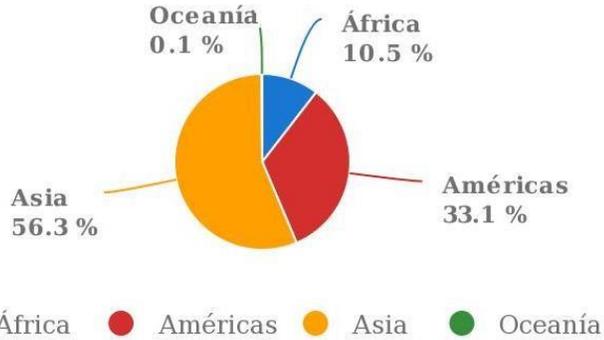


Figura 1.4 Producción mundial de Papaya en porcentajes. Promedio 2015-2017 (FAOSTAT, 2018).

1.4.1 Producción e importancia económica de Papaya en México

En los últimos años, la producción mundial de papaya se ha concentrado en diez países: India, Brasil, México, Indonesia, Nigeria, Republica Dominicana, República democrática, Cuba, Colombia, Venezuela con 5,506,666.67, 1,320,989.33, 932,427.67, 876,958.67, 848,833.67, 830,204.33, 215,585, 201,388, 177,885.67 y 176,347 millones de toneladas respectivamente (Figura 1.5). Respecto a los principales exportadores a nivel mundial, México es el líder mundial en la exportación de papaya, los principales destinos de exportación son Estados Unidos, con el primer lugar (168.7 toneladas con un valor de 87 millones de dólares) seguidos por Brasil y Japón (SENASICA, 2017).

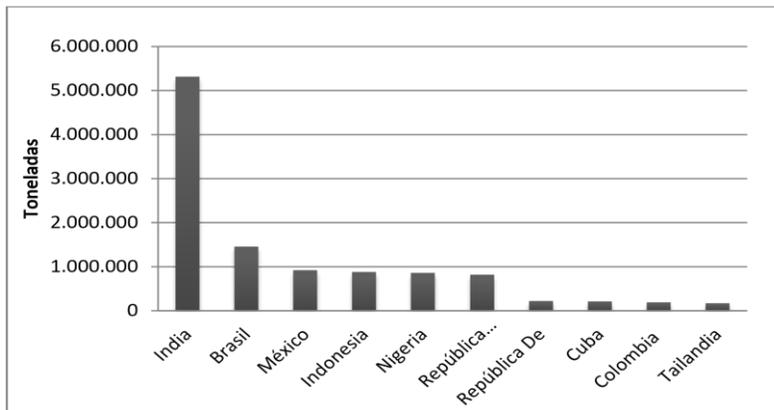


Figura 1.5 Principales países productores de Papaya a nivel mundial. Promedio 2015-2017 (FAOSTAT, 2018).

1.4.2 Producción de Papaya en Yucatán

En Yucatán la actividad agrícola tiene una concentración de cultivos rentables (pepino, papaya, carambola, aguacate y berenjena) y poco rentables como Maíz grano, caña de azúcar, pastos y praderas, frijol y calabaza. Papaya sobresale con una superficie de 477 ha y rendimiento de 26,827 toneladas que equivale al 9% de producción (Indicadores Estatales de Yucatán, 2011, Plan estatal de desarrollo, 2018-2024). Actualmente, Yucatán participa fuertemente en la producción de papaya debido al acelerado crecimiento que ha experimentado en los últimos años también por la generación de empleos que conlleva aportaciones económicas interesantes para la región. Sin embargo, la mayor cantidad de la producción yucateca de papaya se vende al mercado nacional (75%), al consumo estatal se destina un 10% de la producción y el otro 15% de la producción se exporta como en producto fresco, siendo los principales destinos Mac Allen y Miami (Plan Rector del sistema producto de papaya, 2012). Actualmente, Yucatán se ubica entre los 10 principales productores de papaya a nivel nacional, con lo que contribuye a que México sea el 3° productor de esa fruta a nivel mundial con 17,364 toneladas de un total de toneladas a nivel nacional de 951,922 toneladas (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Principales entidades productoras de papaya a nivel nacional (Atlas Agroalimentario, 2017).

Rank	Entidad federativa	Volumen (toneladas)	Variación (%) 2015-2016
	Total, nacional	951,922	7.7
1	Oaxaca	321,178	17.0
2	Colima	146,244	34.2
3	Chiapas	137,941	-15.3
4	Veracruz	104,749	2.2
5	Michoacán	68,528	32.2
6	Guerrero	42,880	4.6
7	Jalisco	27,740	6.4
8	Campeche	20,576	-6.0
9	Yucatán	17,364	-4.9
10	Tabasco	14,032	14.1

1.5 JUSTIFICACIÓN

Las condiciones adversas del medio ambiente provocan una alteración en diferentes mecanismos celulares, fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas provocando daños reversibles o irreversibles que se traducen en pérdidas de producción. Algunas plantas mediante el cambio adaptativo a las condiciones ambientales han desarrollado estrategias que le permiten permanecer en condiciones de sequía, altas temperaturas o en su defecto a una combinación de estreses abióticos. Por lo que mediante la selección de plantas identificadas en el campo se ha realizado mejoramiento genético convencional, sin embargo, no ha sido suficiente para lograr la tolerancia ante el cambio climático. Por ello, se proponen otras estrategias, una de las más prometedoras son los factores de transcripción debido a que ha demostrado que sobreexpresión de genes HSF protegen a las plantas ante un estrés o más de uno en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En *Carica papaya* L. no existen estudios de la función que desempeñan los factores de transcripción de la familia de choque térmico en respuesta a déficit hídrico y/o la dualidad entre déficit hídrico y altas temperaturas. Este conocimiento en *Carica papaya* L. es fundamental para el futuro mejoramiento genético. Por ello nos propusimos evaluar el efecto de la exposición a estrés por déficit hídrico, choque térmico y un estrés combinado similar a lo que ocurre en campo (déficit hídrico más choque térmico) sobre la fisiología de diferentes genotipos, iniciando con una caracterización *in silico* la familia de factores de transcripción de choque térmico, para posteriormente cuantificar la expresión de genes HSF y seleccionar de genes que posiblemente confieran tolerancia a sequía y/o altas temperaturas.

1.6 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuántos miembros de la familia HSF hay en *Carica papaya* L. en comparación con los reportados en *Arabidopsis thaliana*?

¿Los genes HSF solo se expresan en estrés térmico o también aumentan su expresión al exponerse a estrés hídrico o al estrés combinado (alta temperatura más estrés hídrico), en plantas de *Carica papaya* L.?

¿Los genotipos silvestres, al ser más tolerantes, presentan una mayor expresión de HSF a estrés hídrico y térmico, que la variedad comercial?

1.7 HIPÓTESIS

- La exposición de *Carica papaya* L. a estrés térmico debe inducir un aumento en la expresión de genes HSF. De igual forma, la expresión independiente a un estrés por déficit hídrico o al efecto combinado de ambos tipos de estrés, también debe inducir un aumento en la expresión de genes HSF.
- El genotipo silvestre al ser más tolerante a estrés abiótico debe presentar mayor expresión de genes HSF que los genotipos comerciales, al ser expuestos a estrés térmico, déficit hídrico o al efecto combinado de ambos tipos de estrés.
- Durante la exposición al déficit hídrico, la expresión de los genes HSF podrían desempeñar un papel directo e independiente del choque térmico, o mostrar funciones duales a ambos tipos de estrés en genotipos de *Carica papaya* L. Estos genes también estarán involucrados en los mecanismos de tolerancia del genotipo silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico y choque térmico.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la exposición a estrés abiótico sobre la fisiología de *Carica papaya* L. y la expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 para la selección de genes candidatos que confieran tolerancia a estrés por déficit hídrico y altas temperaturas.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar *in silico* la filogenia y la estructura de la familia de genes que codifican los factores de transcripción HSFs de *Carica papaya* L. cv. SunUp en relación con las secuencias de *Carica papaya* L. (genotipos Maradol y Silvestre) derivadas de un estudio transcriptómico previo en respuesta a déficit hídrico.
- Evaluar el efecto de la exposición a estrés por déficit hídrico y recuperación sobre la fisiología y expresión de genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1 de la línea C7 de *Carica papaya* L.
- Evaluar el efecto de la exposición a estrés por: déficit hídrico, por alta temperatura y por el efecto combinado de ambos (déficit hídrico más alta temperatura); y recuperación sobre la fisiología y la expresión de los genes CpHsfA1b, CpHsfA2 y CpHsfB3 en dos genotipos contrastantes de *Carica papaya* L. (Maradol y Silvestre).

1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de tesis se integra en tres áreas: bioinformática, fisiología vegetal y biología molecular (expresión de genes). La primera etapa consistió en realizar una revisión de literatura científica y búsqueda de secuencias, tanto nucleotídicas codificantes de genes HSF como proteicas. Se inició con el análisis bioinformático para aislar *in silico* los genes de interés y se diseñaron oligonucleótidos específicos (Capítulo I y II). Posterior se realizaron análisis fisiológicos de la respuesta de la línea C7 a diferentes tratamientos de déficit hídrico para analizar la expresión por RT-PCR de los genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1 (Capítulo III). Posteriormente, se seleccionaron genes prometedores CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB3 para analizar su respuesta por RTq-PCR a estrés por choque térmico, sequía y estrés combinado (sequía más choque térmico) de dos genotipos contrastantes de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre (Capítulo IV). (Figura 1.6).

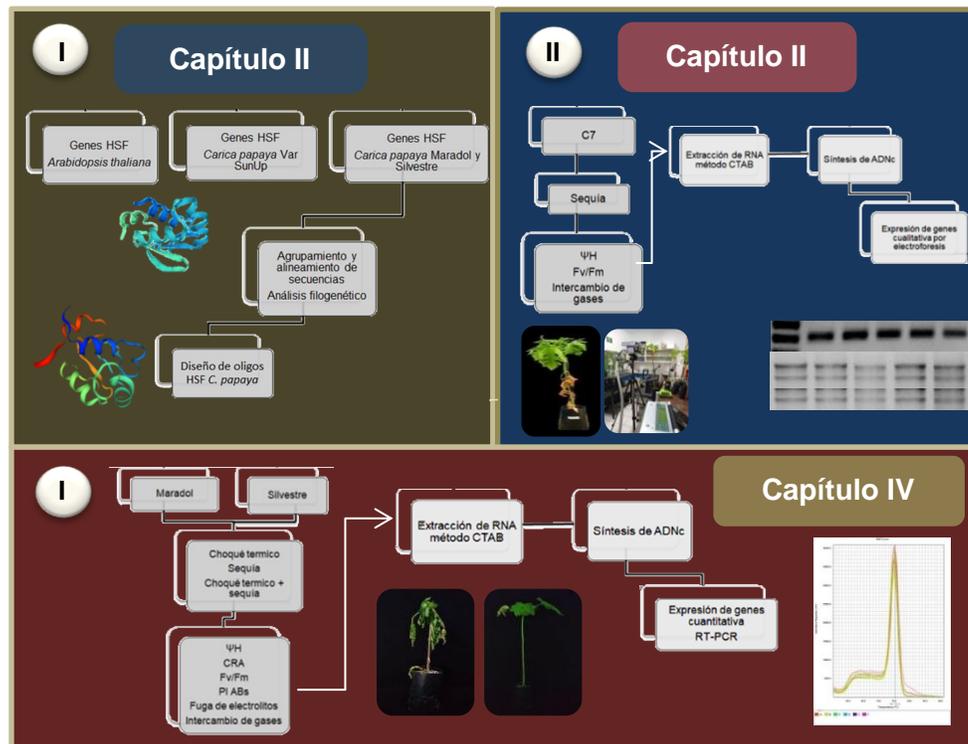


Figura 1.6 Estrategia de trabajo de tesis “CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA POR ESTRÉS ABIÓTICO Y LA PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HSF EN *Carica papaya* L.

CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN *in silico* DE LA FILOGENIA Y LA ESTRUCTURA DE LAS SECUENCIAS DE GENES QUE CODIFICAN A LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE TIPO HSF OBTENIDOS DE UN TRANSCRIPTOMA DE *C. papaya* L. EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO.

2.1. INTRODUCCIÓN

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Genome Initiative, 2000) y del genoma de papaya transgénica *Carica papaya* L. cv. SunUp (Ming *et al.*, 2008), muestran la identificación de genes que han centrado la atención en el análisis funcional. Sin embargo, quedan muchas interrogantes para entender los mecanismos de regulación que ocurren en la célula en condiciones a cambios ambientales (Lowe, 2017). Hoy en día, la transcriptómica se ha convertido en una disciplina extendida, esto gracias al avance en conjunto con otras áreas, lo que han permitido el desarrollo de diversas plataformas y tecnologías de secuenciación masiva en paralelo (Wolf, 2013). Recientemente, la secuenciación de RNA de próxima generación (RNA-seq) se ha transformado en una plataforma versátil con aplicaciones en muchos campos de investigación de biología vegetal que ofrece un método eficaz para identificar secuencias expresadas en tejidos específicos en respuestas a estrés biótico y abiótico (Costa *et al.*, 2017). Por otro parte, se sabe que, en condiciones de campo, los cultivos se someten en forma rutinaria a varias interacciones de estrés abiótico simultáneamente como estrés por sequía y a su vez altas temperaturas; de manera que tienen un efecto negativo significativamente mayor en la productividad que cada uno de los factores individualmente, y no menos importante una respuesta molecular única (Zandalinas *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2015).

En este sentido, la principal familia de factores de transcripción que juegan un papel regulador central en la termotolerancia adquirida es la familia de los HSF, reconoce motivos palindrómicos de unión a DNA, llamados elementos de choque térmico (HSE; 5´AGAAnnTTCT-3´) (Nover *et al.*, 2001). Sobresalen por una estructura modular, bien conservada, caracterizada por la inducción rápida de proteínas de choque térmico que funcionan principalmente como chaperonas moleculares para garantizar la función correcta de muchas proteínas celulares en condiciones de temperatura elevada. En general, la activación transcripcional de HSFs se logra en dos etapas. Primero, los monómeros de

HSF inactivos forman un homo-trímero al recibir una señal de estrés. Luego, el trímero de unión al DNA puede modificarse por fosforilación o someterse a cambios conformacionales que activan la transcripción (Guo *et al.*, 2016; Miller y Mittler, 2006).

En *Arabidopsis thaliana* se han reportado 21 genes HSF. Estos genes se han clasificado en tres clases diferentes (A, B y C). Las proteínas HSF de clase A; poseen el motivo AHA, motivo involucrado en la actividad transcripcional (Von *et al.*, 2007). Los de la clase B pueden ser represores transcripcionales y/o coactivadores al interactuar con genes de HSF de clase A (Czarnecka *et al.*, 2004). Además de la clase B, la clase C carece de un dominio de activación hidrofóbico/ácido (AHA) conllevando a no tener actividad regulatoria de sí mismos por lo que su función está relacionada a la represión y coactivación (Scharf *et al.*, 2012).

Hasta el momento, no hay artículos de la caracterización de la familia HSF en *Carica papaya* L. Por ello, el estudio *in silico* de la familia es interesante debido a su compleja red reguladora, conocer la estructura de la familia HSF de *Carica papaya* L. cv. SunUp, analizar las secuencias de un estudio previo transcriptómico de *Carica papaya* L. de un tipo comercial y silvestre, en respuesta a déficit hídrico (Estrella *et al.*, 2019). Por lo que el objetivo de este capítulo fue la caracterización y análisis de la familia HSF y de los miembros (secuencias) de los HSFs encontrados. Es necesario, el análisis bioinformático para comprender y evidenciar los perfiles de expresión de los genes de interés en plantas de *C. papaya* L. en condiciones de estrés por alta temperatura y déficit hídrico, que se realizaron en el capítulo III y capítulo IV.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Búsqueda de secuencias de genes de choque térmico (HSF)

Se realizó la búsqueda de secuencias de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* en la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <http://arabidopsis.org>). *Carica papaya* L. cv. SunUp en las bases de datos Plant Transcription Factor Database, V3 y V4. Las secuencias anotadas del transcriptoma de *Carica papaya* L., se aislaron de acuerdo con el ID descrito por Estrella *et al.*, en proceso de publicación. Posteriormente, se transformaron las secuencias nucleotídicas en secuencias proteicas en la herramienta softberry (www.softberry.com) para su posible alineamiento.

2.2.2 Divergencia de genes de choque térmico de *Carica papaya* L.

Posteriormente, se sometieron las secuencias proteicas del transcriptoma de *Carica papaya* L. con el apoyo de las secuencias de *Carica papaya* cv. SunUp, previamente caracterizadas por Alcocer (2013), a un análisis de distancia evolutiva mediante una matriz de distancia aplicando la fórmula $(1-N) * 100$ para conocer a que grupo o subgrupo de la familia de HSF pertenecen las secuencias diferencialmente expresadas del transcriptoma de *Carica papaya* L. en respuesta a déficit hídrico.

2.2.3 Alineamiento de secuencias proteicas de genes HSF

Una vez obtenidas las secuencias transformadas se sometieron a un alineamiento múltiple utilizando la herramienta de alineación MUSCLE, con Gap abierto de -2.9, Multiplicador de hidrofobicidad de 1.2 y el método de pares y grupos no ponderados con aritmética (UPGMA) realizado en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Para identificar los dominios conservados característicos de los genes de choque térmico (HSF), se exportó el alineamiento en formato Fasta al software BioEdit V.7 (Hall, 1999), con las características siguientes; 80 residuos por fila, aminoácidos idénticos en negrita, aminoácidos similares en gris, y en blanco aminoácidos divergentes.

2.2.4 Análisis filogenéticos de la familia HSF de *Carica papaya* L.

Para generar la filogenia de la familia de choque térmico (HSF) se involucraron un total de 50 secuencias de proteínas de *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya* cv. SunUp y *Carica papaya*_transcriptoma, por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo fundamentado en la matriz de Jones Taylor Thornton (JTT). Para evaluar el nivel de soporte

estadístico para cada nodo del árbol se utilizó una prueba de Bootstrap con 1000 réplicas. La construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) y se exportó, se visualizó y editó en la plataforma iTOL (Letunic y Bork, 2016).

2.2.5 Modelaje tridimensional de proteínas HSF de *Carica papaya* L.

Para comprobar si las secuencias, presentaban una alineación tridimensional similar a la estructura típica del dominio descrito por Damberger *et al.* (1994). Se realizó un modelaje por homología de la estructura tridimensional de las secuencias encontradas en el transcriptoma de *Carica papaya* L. en respuesta a déficit hídrico, utilizando el programa SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018). Además, se comparó con el modelaje tridimensional de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* publicadas en UniProt, Consortium (2015).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Factores de transcripción HSF de *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L.

De la revisión en las bases de datos, se encontraron los números de accesiones para las secuencias de los genes HSF. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se revelaron la existencia de 21 marcos de lectura abierta (ORF) que codifican a HSFs (15 en el grupo A, 5 en el grupo B y 1 en el grupo C). En *Carica papaya* cv. SunUp encontramos 18 secuencias (12 en el grupo A, 5 en el grupo B y 1 en el grupo C) y en el transcriptoma de *Carica papaya* L. se expresaron diferencialmente 11 genes (6 en el grupo A, 4 en el grupo B y 1 en el grupo C), en respuesta a déficit hídrico, secuencias que fueron aisladas e identificadas con los siguientes números de ID: c19554_g1_i1, c27657_g1_i2, c7565_g1_i1, c26118_g1_i3, c27214_g2_i1, c22475_g1_i2, c21583_g1_i2, c63956_g1_i1, c23178_g1_i1, c23059_g1_i1, c22133_g1_i2 (Estrella *et al.*, en proceso).

2.3.2 Divergencia de genes HSF de *Carica papaya* L.

En el análisis de la matriz de distancia (Cuadro 2.1) entre las 18 secuencias proteicas de *Carica papaya* L. cv. SunUp y las 11 secuencias HSF expresadas diferencialmente del transcriptoma de *Carica papaya* encontramos las clases y subclase A: CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfA4a, CpHsfA9, CpHsfA6b, B: CpHsfB3, CpHsfB2a, CpHsfB1, CpHsfB2b: y C: CpHsfC1, de acuerdo con su porcentaje 93.6-100% de identidad. Así mismo se verifico la asignación de clases y subclase con el árbol filogenético, con la nomenclatura. El nombre de cada HSF inicia con las dos letras iniciales del nombre de género y especie a la que pertenece, para diferenciar las secuencias transcriptómicas de *Carica papaya* L., se simbolizo de la siguiente manera; CpHsf_T.

Cuadro 2.1 Matriz de distancia entre las secuencias HSF de *Carica papaya* L. cv. SunUp y secuencias de un transcriptoma previo en respuesta a déficit hídrico.

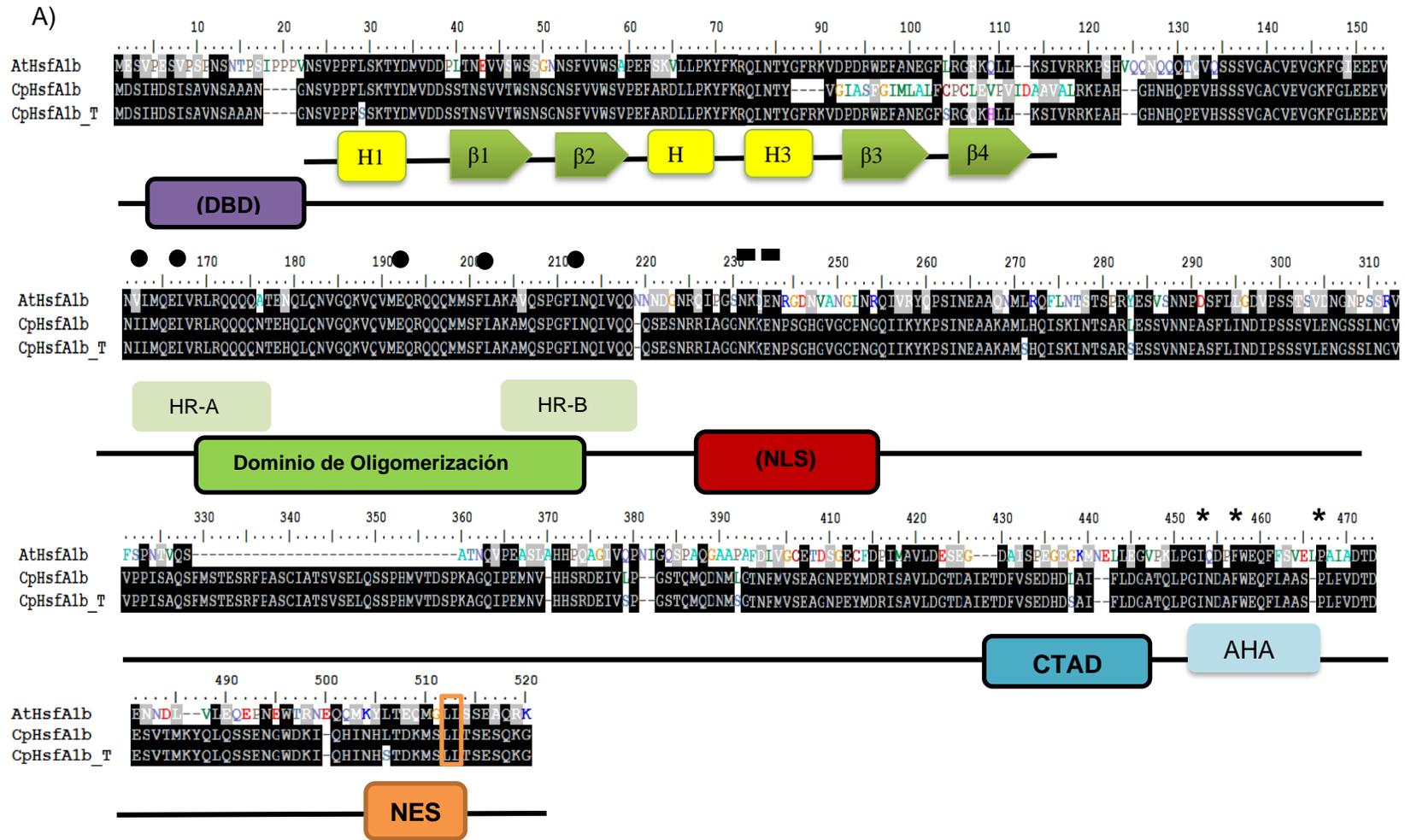
	c7565_ g1_i1	c19554_ g1_i1	c21583_ g1_i2	c22133_ g1_i2	c22475_ g1_i2	c23059_ g1_i1	c23178_ g1_i1	c26118_ g1_i3	c27214_g 2_i1	c27657_g 1_i2	c63956_ g1_i1
CpHsfA1a	34.88	51.59	30.55	27.83	40.63	35.71	36.97	27.76	31.79	27.7	43.6
CpHsfA1b	26.2	95.2	26.4	21.3	31.5	30.6	33.6	21.8	22.3	19.8	40.3
CpHsfA1d	24.6	38	31.3	27.8	33.5	44	98.4	30.3	27.1	28.7	51.9
CpHsfA2	42.3	42.9	26.9	26.5	100	36.6	34.5	41.7	36.4	31.3	37.1
CpHsfA3	15.4	46.3	37.3	42.7	41	50.6	47.1	27.2	45.8	46.9	40.3
CpHsfA4a	24	35.5	31.2	23.5	33.2	98.8	44.2	28.2	28.2	27.9	51.9
CpHsfA5	25.3	31	28.7	25.4	31.9	34.9	34.6	30.2	30	27.5	40.3
CpHsfA5a	22.9	38.1	41	40.4	37.4	36.9	40.4	36.9	39	41.7	41.9
CpHsfA6b	100	41.2	28.9	31.6	46.4	33.7	35.8	34.4	33.7	31.6	49.1
CpHsfA7a	52.1	44.4	28.7	30.5	48.6	38.4	39.7	35.8	37.5	33.5	41.9
CpHsfA8	30.7	36.4	26.6	24.7	35.2	30.7	28.9	30.3	28.3	23.8	35.2
CpHsfA9	27.2	27.9	30	20.6	39.6	28.8	28.7	93.6	28.5	25.7	32.3
CpHsfB1	18.8	26.7	37.3	37.3	31.3	27.8	28.7	25.8	28.5	99.6	70.8
CpHsfB2a	20.5	27.3	34.1	99.7	28.3	24.3	28.5	23.3	26.8	36.6	72.9
CpHsfB2b	19.4	26.4	37.5	49.5	28.9	27.8	28.1	23.7	26.3	40.1	100
CpHsfB3	16.4	31.3	100	32.4	27.2	30.4	30.6	29.1	23.7	36.9	48.4
CpHsfB4	64.7	59.5	57	59.7	52.1	63.3	60.6	50.4	56.9	72.5	57.4
CpHsfC1	25.2	29.2	24	26.9	36.4	27.8	26.7	28.7	99.7	28.1	39.6

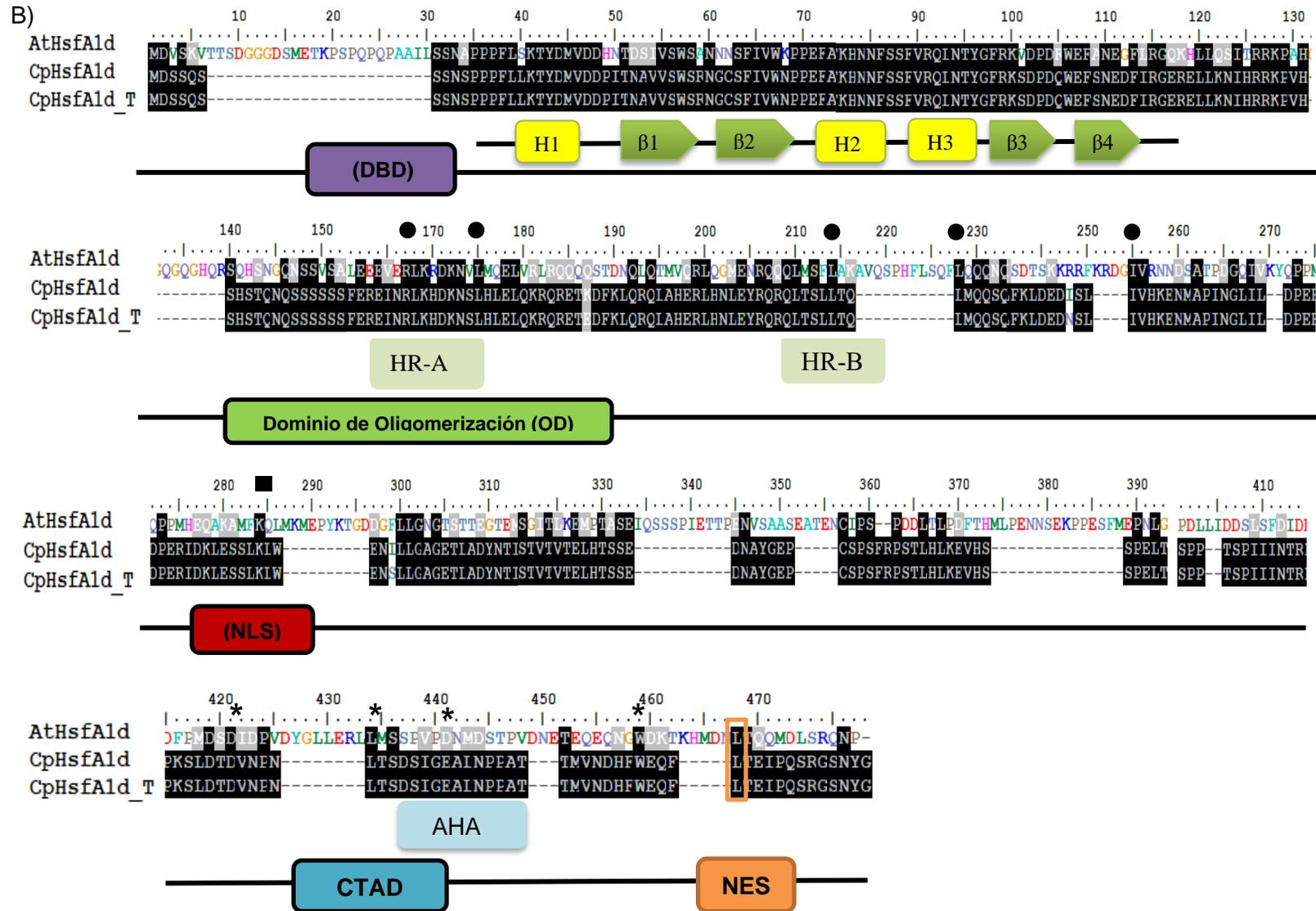
2.3.3 Alineamiento de genes HSF en *Carica papaya* L.

Los resultados de alineamiento múltiple de las secuencias proteicas HSFs de *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya* L. cv. SunUp y *Carica papaya*_transcriptoma muestran claramente los dominios altamente conservados, los cuales se indican en diferentes colores (Figura 2.1), de los genes de interés: CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1; en morado, se señala el dominio de unión al DNA (DBD) con sus respectivas tres hélices (H1, H2, H3) y las cuatro hebras plegadas (β 1, β 2, β 3, β 4) que comprenden el motivo hélice-giro-hélice características de las proteínas HSF, con puntos se indica las dos regiones hepta-hidrofóbicas, denominadas HR-A y HR-B, necesarias para la oligomerización (OD), en rojo la señal de localización nuclear (NLS), en naranja la señal de exportación (NES) y en azul el dominio de activación C-terminal (CTAD), con los motivos AHA. Se señalan con cuadros, los residuos básicos K y R característicos de NLS. Se señalan con asteriscos, los residuos de aminoácidos aromáticos (W), hidrofóbicos (L) y ácidos (E), característicos del dominio CTAD. Se indica el residuo de leucina (L) en la señal de exportación (NES). En general, se reconoce que los miembros de HsfB y HsfC no contienen un dominio de activación rico en residuos (AHA), aromáticos (W, F, Y, F) e hidrofóbicos (L, I, V, M) presentes en miembros de la clase A. Mientras que en el grupo B y C, en *Arabidopsis thaliana* se reconocen un péptido con cuatro aminoácidos **-KLFGV-** responsable de la represión transcripcional (Ikeda *et al.*, 2011). Señalado con un cuadro azul dentro de las secuencias de los grupos, en la región C-terminal (Figura 2.1D-G). El alineamiento reveló que el DBD altamente conservado es ubicado cerca del extremo N terminal en los primeros 90-130 aminoácidos en todos los HSFs de *Carica papaya* L. analizados en este documento. Además, observamos un alto porcentaje de identidad entre las secuencias de *Carica papaya* transgénica y secuencias resultantes de transcriptoma en respuesta a déficit hídrico en *Carica papaya* Maradol y silvestre en los genes de interés para este estudio, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1. Respecto a la longitud de secuencias el gen CpHsfA1a es el más largo de la familia HSF, con 523 pb y el gen más corto es CpHsfB3 con 277 pb. Además, encontramos los aminoácidos descritos de cada uno de los dominios característicos de la familia HSF, principalmente hidrofóbicos (L, I, V, M) responsables de la activación transcripcional en los tres HSF analizados en *Carica papaya*.

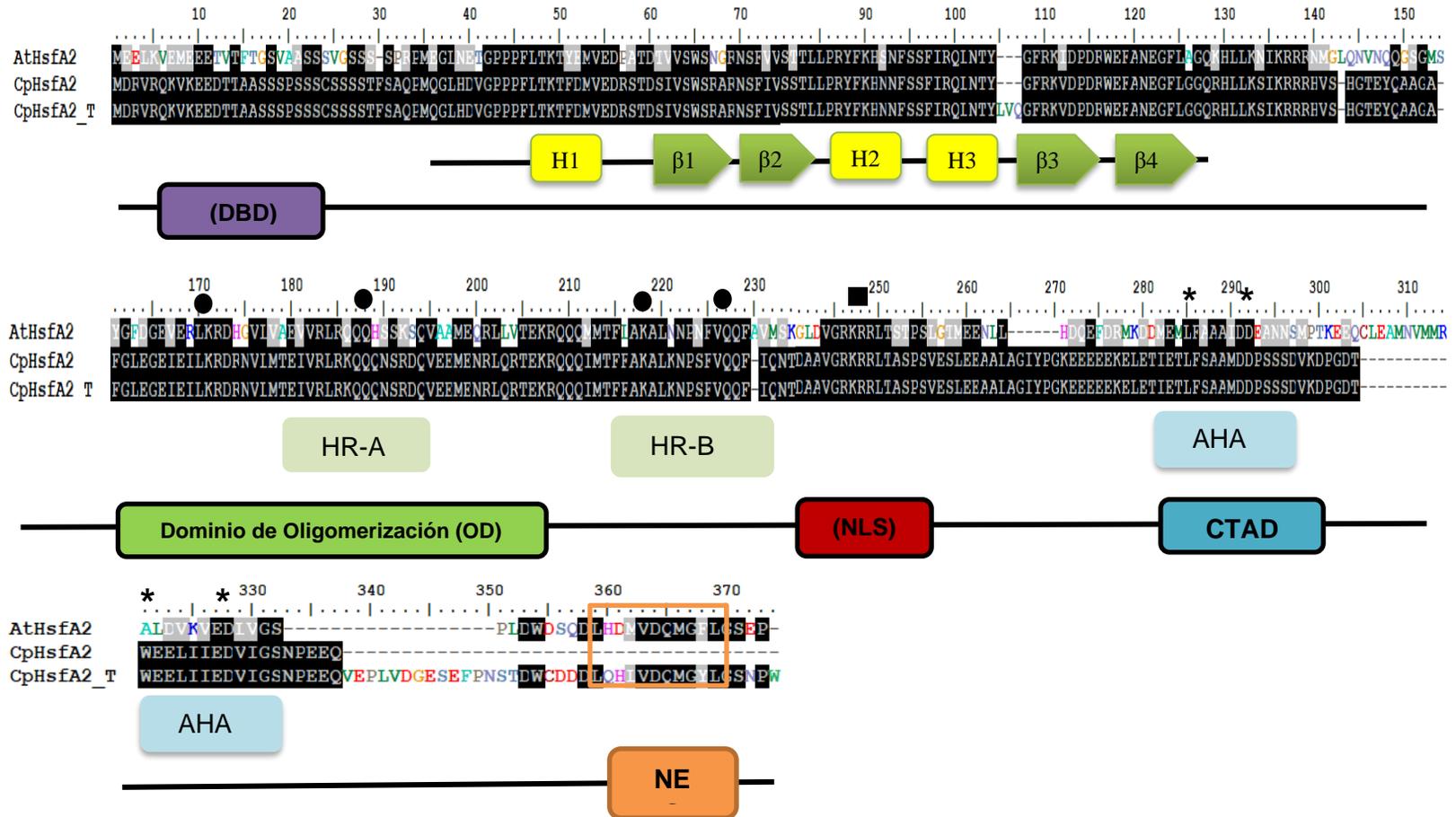
Es interesante, encontrar diferencias de residuos en las secuencias de *Carica papaya* transgénica y secuencias de *Carica papaya* transcriptómicas, con la que encontramos en este trabajo, donde hay una ausencia de la señal de exportación nuclear (rica en leucina), entre 360-370 pb, reportada en papaya transgénica, del gen HsfA2 (Figura 2.1C). En dicho sitio, *Arabidopsis thaliana* (AtHsfA2) y la secuencia de transcriptoma de *Carica papaya* (CpHsfA2_T), tienen 100% de aminoácidos idénticos. Sin embargo en la secuencia que nosotros encontramos, no presenta esta región (cuadro naranja). Se ha descrito que la presencia de los dominios NES y NLS son esenciales para el traslado de HSFs entre el núcleo y el citoplasma (Giorno *et al.*, 2012). En procariontes, las mutaciones puntuales de aminoácido en el NLS o ausencia inhiben la formación de trimeros para llevar a cabo la transcripción (Nakai y Ishikawa, *et al.*, 2000).

Clase A



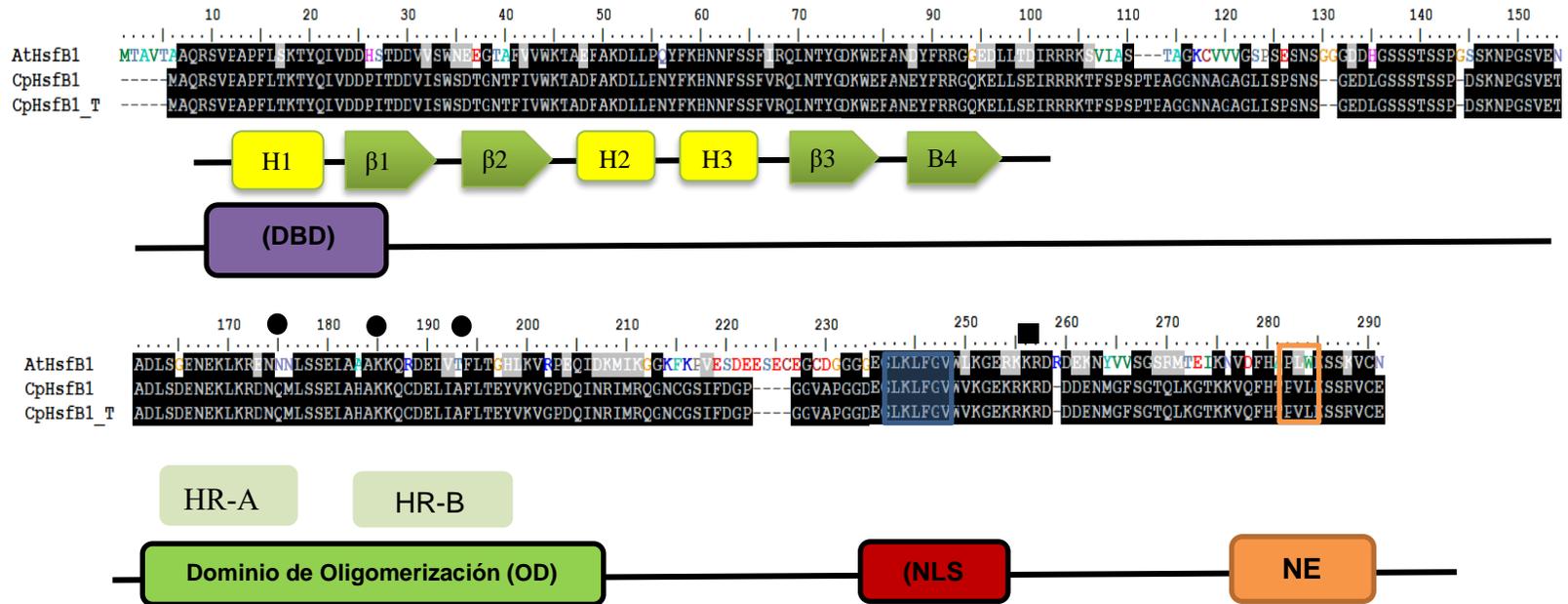


C)

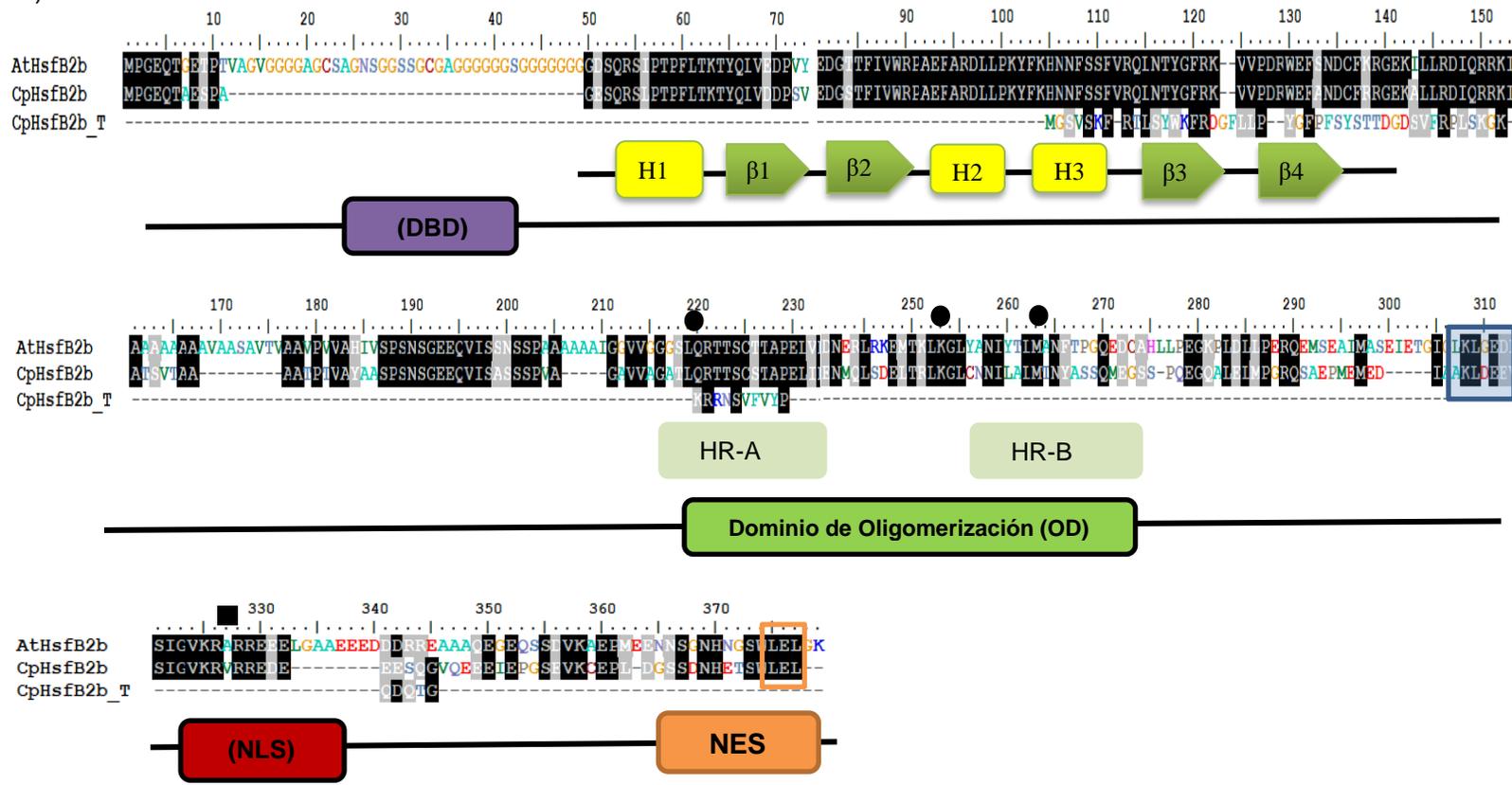


Clase B

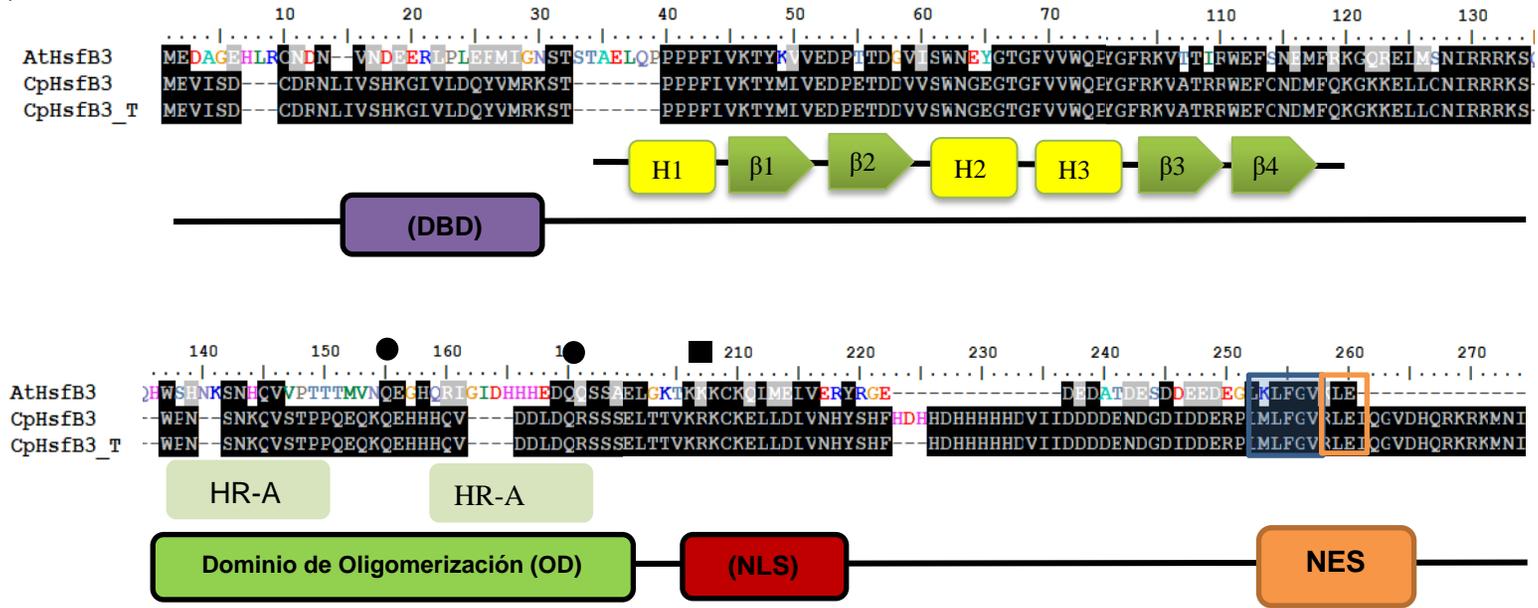
D)



E)



F)



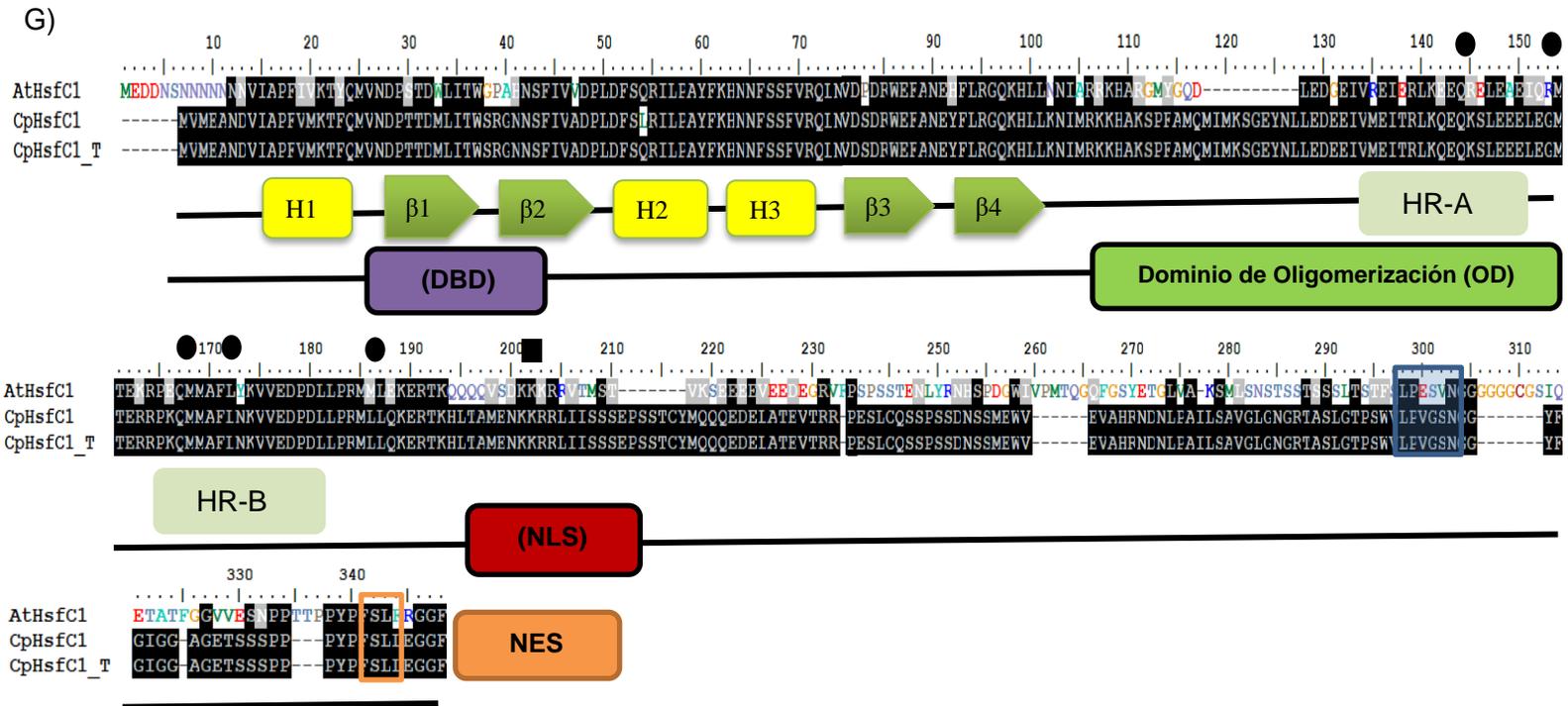


Figura 2.31 Identificación de dominios característicos de secuencias proteicas de choque térmico en *Carica papaya* L. A) CpHsfA1b, B) CpHsfA1d, C) CpHsfA2, D) CpHsfB2b, E) CpHsfB1, F) CpHsfB3 y G) CpHsfC1. Se separan en tres clases grupo A, grupo B y grupo C. En cada caso, se realiza la homología entre secuencias de *A. thaliana* y *C. papaya*. En morado, se indica el dominio de unión al DNA (DBD), motivo hélice-giro-hélice (H2-T-H3), en verde el dominio de oligomerización (OD), en rojo la señal de localización nuclear (NLS), en naranja la señal de exportación (NES) y en azul el dominio de activación C-terminal (CTAD). Se señalan con cuadros los residuos básicos K y R característicos de NLS, los residuos de aminoácidos aromáticos (W) hidrofóbicos (L) y ácidos (E) característicos del dominio CTAD y se indica el aminoácido leucina (L) característico de la señal de exportación (NES). El fondo negro indica aminoácidos idénticos del 100%, el gris indica aminoácidos similares al 75%, y el fondo blanco corresponde a

2.3.4 Análisis filogenéticos de la familia HSF de *Carica papaya* L.

Para analizar la organización filogenética de la familia HSF, se realizó un análisis filogenético de 18 HSFs de papaya cv. SunUp, 21 HSFs de *Arabidopsis thaliana* y 11 secuencias provenientes de un análisis transcriptómico de papaya Maradol y Silvestre en respuesta a estrés hídrico (Figura 2.2). Todos los HSFs se clasificaron en tres clases principales: clases A, B y C y en varias subclases adicionales. En este estudio, las clases se agruparon en dos cladogramas principales y cuatro subcladogramas presentes, señalados con líneas punteadas. Mostramos que los miembros de la clase B forman un clado subdividido en grupos distintos (B1, B2, B3 y B4), los miembros de la clase A forman al menos nueve grupos más pequeños (A1 a la A9), incluyendo el subgrupo C1 que es cercano evolutivamente a los grupos A8 y A7.

La familia HSF en *Carica papaya* L. no presenta las subclases HsfA1e, HsfA6a, HsfA7b y HsfA4c, como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, además encontramos que del análisis que con anterioridad se realizó en el grupo, las secuencias transcriptómicas se agruparon con las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* L. cv. SunUp en el grupo y en los subgrupos correspondientes. Así mismo, la secuencia CpHsfA5a solo la presenta *Carica papaya* L. cv. SunUp y se agrupa con los miembros del grupo B3 de *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente, confirmamos que las secuencias del transcriptoma que encontramos en *Carica papaya* L. en respuesta a déficit hídrico (CpHsfA1b, CpHsfA6b, CpHsfC1, CpHsfA2, CpHsfA9, CpHsfA1d, CpHsfA4a, CpHsfB2a, CpHsfB2b, CpHsfB1 y CpHsfB3) son secuencias homologas a las de *Arabidopsis thaliana* y papaya transgénica.

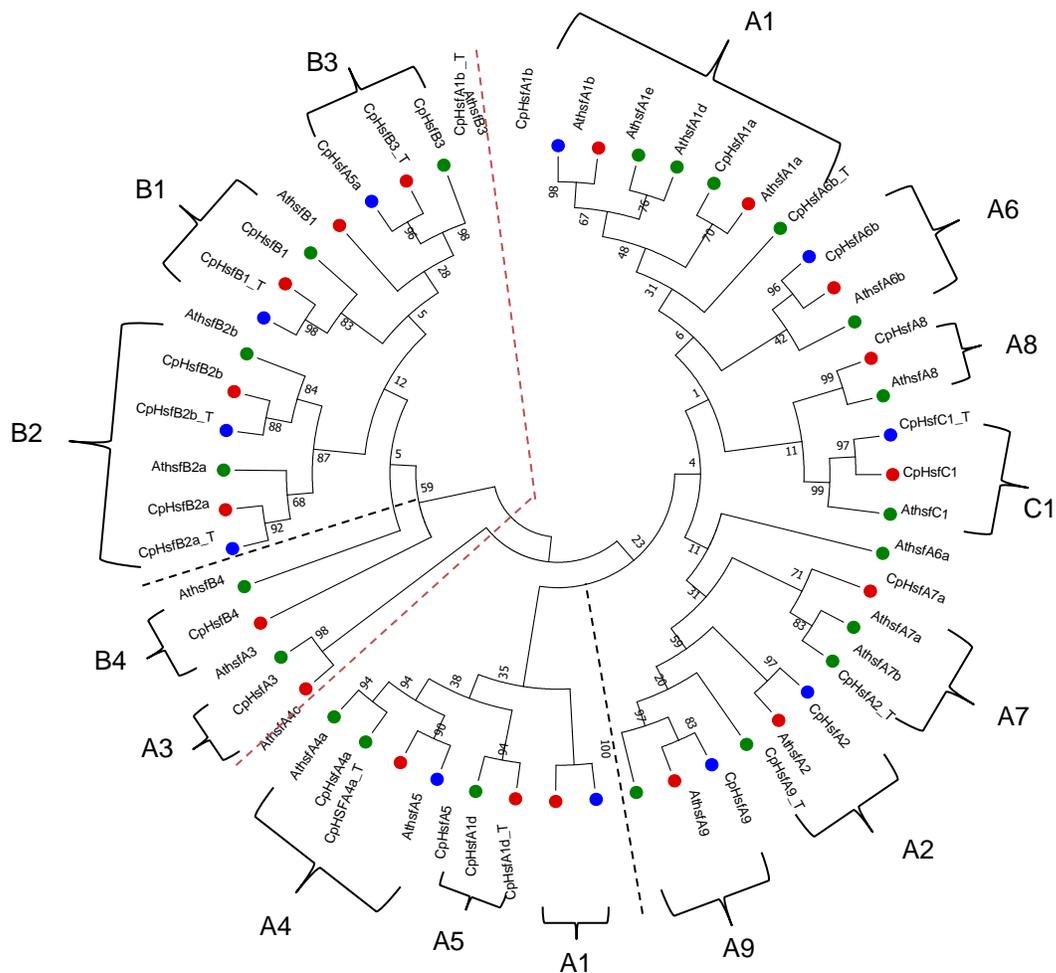


Figura 2.2 Árbol filogenético entre secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Carica papaya* por método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo basado en la matriz Jones Taylor Thornton (JTT). El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1000 repeticiones. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 7.0. Se muestra relación existente entre las 21 secuencias proteicas de *Arabidopsis* (círculos verdes), las 18 secuencias de *Carica papaya* L. cv. SunUp (círculos rojos) y las 11 secuencias del transcriptoma de *Carica papaya* en respuesta a déficit hídrico (círculos azules). Se observan las clases A, B y C de las HSF. También se observan los subgrupos de cada clase.

2.3.5 Análisis filogenéticos de las secuencias HSF en respuesta a estrés hídrico.

De acuerdo con el análisis filogenético anterior, se realizó otro análisis dirigido a secuencias proteicas responsivos a estrés por déficit hídrico (Estrella *et al.*, 2019), algunas de las cuales fueron seleccionadas para el estudio de expresión de genes, que corresponde al capítulo III, de esta tesis: CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1 (Figura 2.3). Además, incluimos el gen CpHsfA1a como candidato en respuesta a altas temperaturas de acuerdo con los resultados de Alcocer, (2013). Encontramos dos clados, en el primer clado se agruparon los genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CHsfB1, CpHsfB2b y CpHsfB3 con su respectivo ortólogo, la secuencia de AtHsfA1d de *A. thaliana* no se agrupó con las secuencias de papaya. En el segundo clado, observamos que el gen CpHsfA2 y CpHsfC1 comparten el mismo clado.

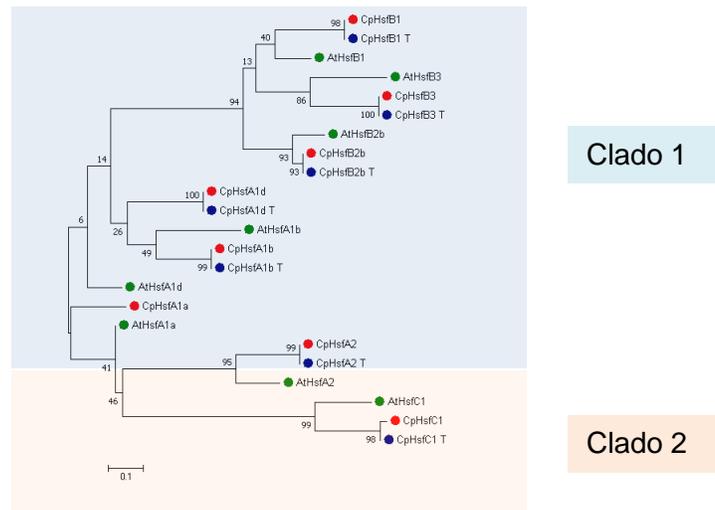


Figura 2.3 Árbol filogenético de genes expresados diferencialmente en respuesta a sequía en *Carica papaya* L. por método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo basado en la matriz Jones Taylor Thornton (JTT). El árbol de consenso bootstrap 1000 repeticiones. *Arabidopsis thaliana* (círculo verde), *Carica papaya* L. cv. SunUp (círculo rojo) y transcriptoma de *Carica papaya* L. (círculo azul).

2.3.6 Modelos estructurales de las tres clases de proteínas HSF

La estructura tridimensional del dominio más conservado para todos los HSFs: el dominio de unión al DNA de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB3 y CpHsfC1, aisladas del transcriptoma de *Carica papaya* L y *Carica papaya* L. cv. SunUp mostraron las tres hélices (H1, H2, H3) y las cuatro hebras plegadas (β 1, β 2, β 3, β 4), que comprenden el motivo hélice-giro-hélice características de las proteínas HSFs de *Arabidopsis thaliana* (Figura 2.4). Esta región se encuentra en los primeros 90-130 pb, con 12 de 27 aminoácidos idénticos localizada cerca de la región N terminal. Los HSFs se distinguen de otras proteínas de hélice-giro-hélice por la presencia de una protuberancia α -helicoidal y un pliegue inducido por prolina que distorsiona significativamente la segunda hélice y por un tum extendido de 5-7 residuos separando la segunda y tercera hélices (Wu, 1995). Estas estructuras son necesarias para la unión constitutiva a los promotores de choque térmico en secuencias llamados elementos de choque térmico (HSE), y la eliminación de una de las hélices da como resultado una disminución en la actividad transcripcional de HSF en condiciones constitutivas e inductivas por el calor (Cicero *et al.*, 2001). Observamos diferencia en aminoácidos que causo diferencia en la estructura DBD cv SunUp del gen CpHsfA1b, en la hebra plegada β 3, respecto a *Arabidopsis* y secuencia transcriptómica. La secuencia CpHsfB2b no presentó las características estructurales de unión al DNA, sugiriendo que la secuencia no esté completa, probablemente derivado de la limpieza del análisis previo del transcriptoma en respuesta a déficit hídrico. La eliminación de residuos de α -helicoidal en la segunda hélice disminuye significativamente la estabilidad térmica del dominio, en al menos 15 °C en levadura (Bulman *et al.*, 2001).

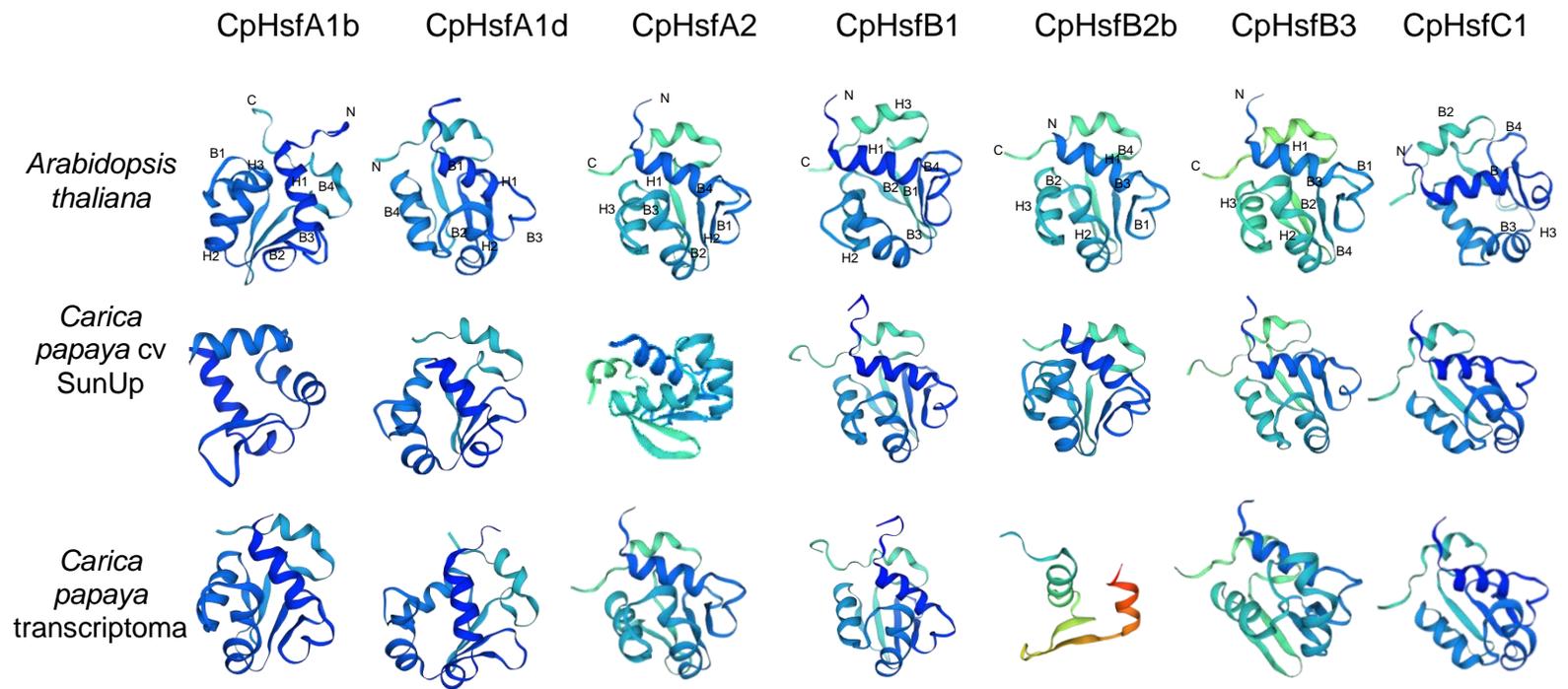


Figura 2.4 Comparación de las estructuras proteicas de *Arabidopsis thaliana* con respecto a sus secuencias ortólogas en *Carica papaya* cv SunUp y *Carica papaya* L. de las subclases CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1.

2.3.7 Predicción de localización de la familia de genes HSF en *Carica papaya*

L.

Los HSF trabajan junto con las HSP para controlar la expresión génica, con la ventaja de interactuar directamente con el DNA y son activados en respuesta a estrés biótico y abiótico para controlar procesos de desarrollo y homeostasis celular. En un estudio de inmunofluorescencia por Lyck *et al.* (1997), en tomate demostraron que el gen SIHsfA1 en un estado control de 25 °C, se encontraba entre el citoplasma y el núcleo, mientras que, durante el estrés por calor, se encontró una tinción nuclear exclusiva (debido a su acción de factor de transcripción) y al recibir un periodo de recuperación, una parte considerable de HsfA1 regresó al citoplasma.

Para conocer la localización intracelular de los HSFs de *Carica papaya* L., se realizó una predicción de sitios de localización de proteínas HSF en las células mediante el programa PSORT. Encontramos que las 18 secuencias HSF del cv SunUp, su actividad está restringida en el núcleo (confirmando que son factores de transcripción), con un 68%-97% de identidad comparada con la secuencia de *A. thaliana*, *Zea mayz* y *Solanum lycopersicum* (Cuadro 2.1). Además, el software ofrece información adicional; el gen CpHsfA1b responde al ácido abscísico y al estrés oxidativo, CpHsfA3 es requerido para el desarrollo del saco embrionario y núcleo, también puede regular la morfología de los órganos laterales, reprimiendo la producción de auxinas, CpHsfA5a probablemente actúa como un activador y está involucrado en la regulación de la expresión génica por factores de estrés.

Cuadro 2.2 Análisis *in silico* de la localización subcelular de proteínas de choque térmico basado en porcentaje de identidad en *Carica papaya* L.

Gen	ID	sitio	Identidad
CpHsfA1a	At2g35670.1	núcleo	86%
CpHsfA1b	At2g39810.1	núcleo	92%
CpHsfA1d	ARRA_ARATH	núcleo	70%
CpHsfA2	At2g26300.1	núcleo	96%
CpHsfA3	At2g28550.1	núcleo	68%
CpHsfA4a	Hsf8_LYCPE	núcleo	70%
CpHsfA5	HX1A_MAIZE	núcleo	89%
CpHsfA5a	At2g46340.1	núcleo	97%
CpHsfA6b	HSF8_LYCES	núcleo	77%
CpHsfA7a	At5g41410.1	núcleo	84%
CpHsfA8	At4g39780.1	núcleo	76%
CpHsfA9	HKN1_MAIZE	núcleo	88%
CpHsfB1	HSF1_ARATH	núcleo	73%
CpHsfB2a	Hsf2_LYCPE	núcleo	76%
CpHsfB2b	AGL1_ARATH	núcleo	76%
CpHsfB3	At2g32950.1	núcleo	87%
CpHsfB4	Hsf3_LYCPE	núcleo	88%
CpHsfC1	Hsf3_LYCPE	núcleo	70%

2.4 DISCUSIÓN

Existen diferencias en número de factores de transcripción de choque térmico entre *Carica papaya* L. cv. SunUp y *Arabidopsis thaliana*. De acuerdo con el tamaño de genoma y el número de genes, el genoma de *Carica papaya* L. cv. SunUp de 372 megabases (Mb), mayor, en relación con el de *Arabidopsis thaliana* que tiene 120 megabases (Mb). Respecto al número de genes, la planta modelo de *Arabidopsis* presenta 31,114 y mientras que *Carica papaya* L. tiene 24,746 genes (Ming *et al.*, 2008; Goodman *et al.*, 1995). Los factores de transcripción están representados por menos genes en papaya (2,438 genes) mientras que en *Arabidopsis thaliana* están representados por más genes (2,897 genes). En específico confirmamos los 21 marcos de lectura abierta que codifican a HSFs en *Arabidopsis thaliana* mientras que en *Carica papaya* L. cv. SunUp solo encontramos 18 secuencias, ambos divididos en tres grupos A, B y C, de los cuales *Arabidopsis thaliana* presenta 4 subclases adicionales (AtHsfA1e, AtHsfA4c, AtHsfA6a, AtHsfA7b). Una explicación al diferente número de genes entre las dos especies es el evento de evolución de las plantas. Para algunas especies dicotiledóneas como: *Arabidopsis thaliana* (21), *Solanum lycopersicum* (24), *Solanum tuberosum* (27), *Glycine max* (34) y monocotiledóneas como: *Oryza sativa* (25) y *Zea mays* (25), se puede deber a la divergencia y en consecuencia la duplicación o triplicación segmentaria que se dió hace millones de años en diferentes etapas de evolución. De manera explícita, HsfA9, HsfB3 y HsfB5 son genes específicos en plantas dicotiledóneas que indican que estos tipos pudieron aparecer después de la diferenciación de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Varios HSFs son específicos de monocotiledóneas o dicotiledóneas, en el caso de las monocotiledóneas desarrollaron un grupo específico que contiene a HsfC1a, HsfC1b, HsfC2a y HsfC2b, mientras que en la mayoría de las dicotiledóneas solo existen miembros del tipo C1 como en *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* y *Glycine max* (Tang *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2013), lo cual es consistente con lo encontrado en esta tesis.

La diversificación y número de genes HSF entre especies indica que las plantas pueden tener múltiples funciones para prevenir el daño por estrés. De las secuencias HSFs de *Arabidopsis* y *Carica papaya*, el gen CpHsfA5a es único de papaya cv. SunUp, este gen ha sido reportado en otros cultivos de interés agronómico como: *Pyrus bretschneideri*,

Malus domestica, *Fragaria*, *Pyrus communis* y *Vitis Vinifera* (Cai *et al.*, 2019; Qiao *et al.*, 2015).

Los mismos autores han reportado alta expresión de los genes HsfA4a, HsfA5a y HsfA8a en *Pyrus bretschneideri* en diferentes etapas de desarrollo del fruto. En el trabajo de Kari du Plessis (2017), confirma en *Vitis vinifera* que los genes HsfA4a, HsfA4b y HsfA5a se expresan de igual manera en las primeras etapas de desarrollo. Años más tarde, Li *et al.* (2019), estudiaron en rosa el nivel de expresión del gen HsfA4a y HsfA5a en respuesta a estrés térmico, la cual fue significativa a las 2 h y 12 h de tratamiento. Sin embargo, en el caso de *Carica papaya* L. no hay información sobre el gen HsfA5a, esto podría ser motivo para siguientes investigaciones, ya que los genes ortólogos pueden o no tener la misma función (Tang *et al.*, 2016). En nuestro trabajo identificamos 11 genes HSF en respuesta a déficit hídrico: CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfA4a, CpHsfA9, CpHsfA6b, CpHsfB3, CpHsfB2a, CpHsfB1, CpHsfB2b y CpHsfC1, de los cuales 8 fueron analizados en el capítulo IV.

Identificamos, los dominios característicos de la familia Hsf, un dominio de unión al DNA muy conservado en los primeros 90-130 pares de bases (pb), que consiste en una lámina β antiparalela de cuatro cadenas (β 1- β 2- β 3- β 4) y tres α -hélices (H1, H2, H3), según lo determinado y consistente con el alineamiento reportado por Guo *et al.* (2008). Para los HSFs de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*: la segunda y la tercera hélice están encargadas de formar un motivo típico de hélice-giro-hélice, con la tercera hélice, estableciendo contactos específicos del ácido nucleico con los elementos de choque térmico (HSE), que contiene tres repeticiones de GAA, y que pudieron haber surgido para una interacción más específica de unión y más estable, para los HSF en la regulación de la respuesta al choque térmico (Drees *et al.*, 1997). De acuerdo, a nuestro alineamiento y modelos estructurales del dominio DBD, observamos diferencia en aminoácidos que causó discrepancias en la estructura DBD del cv SunUp del gen CpHsfA1b, en la hoja β 3, respecto a *Arabidopsis* y secuencia transcriptómica. Un cambio, o ausencia en las mismas inhiben la actividad de unión al DNA, lo que conduce a una disminución de la expresión de genes diana. Sin embargo, Hubl *et al.* (1994), identificaron los aminoácidos críticos en el dominio de unión del DNA del factor de

transcripción de choque termico de *Saccharomyces cerevisiae* y encontraron que al cambiarlos por alanina no hay efecto observable en la función.

Otro de los requisitos en la función de HSF es la formación de trimeros mediante el dominio de oligomerización reconocidos por repeticiones de heptadas hidrófobas HR-A y HR-B, ya que esta involucrado en la regulación de la actividad de HSF: en condiciones sin estrés, HSF es monomérico y se encuentra en el citoplasma, mientras que, en el estrés, la proteína se trimeriza y se trasloca al núcleo (Peteranderl *et al.*, 1999; Nover *et al.*, 1996). En los genes de *Carica papaya*: CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfA4a, CpHsfA9, CpHsfA6b, CpHsfB3, CpHsfB2a, CpHsfB1, CpHsfB2b y CpHsfC1 encontramos el patrón heptada HR-A y HR-B de residuos hidrofóbicos (I, M, L, Q) como lo describe Nover *et al.* (2001). Sin embargo, el comportamiento de oligomerización aún no esta del todo claro, existe evidencia de que el tomate SIHsfB1 coexiste como dímero, mientras que SIHsfA1 y SIHsfA2 son trímeros por lo que se ubican en el núcleo.

La diferencia entre las clases de HSF, en parte se debe a la presencia de un dominio de activación C-terminal (CTAD) para muchas HSFs de la clase A. En nuestra investigación de dominios conservados se encontraron los motivos AHA ricos en residuos de aminoácidos aromáticos (W, F, Y), hidrófobos (L, I, V) y ácidos (D,E), en la clase A de *Carica papaya* como lo describe Xue *et al.* (2014), en *Triticum aestivum*. Sin embargo, a diferencia del CpHsfA1d, CpHsfA1b el grupo CpHsfA2 presentó dos motivos AHA en el dominio de activación C-terminal (CTAD). En tomate, el gen SIHsfA1 y SIHsfA2 contienen dos motivos AHA que contribuyen al potenciar la activación transcripcional. La eliminación por mutación de cualquiera de los dos motivos AHA dio como resultado una reducción del 20 al 50% en el potencial de activación en los genes SIHsfA1 y SIHsfA2 (Döring *et al.*, 2000). Para el gen HsfA1b, el reportero GUS y los ensayos desplegables de glutatión transferasa, respaldan la existencia de un único motivo AHA (Kotak *et al.*, 2004), ubicado a los 453 pb en *Arabidopsis thaliana* (DP FW EQ FF SV) y que es respaldado por nuestro alineamiento en las dos secuencias de *Carica papaya* L. (DA PW EQ FL AA) con 100% de aminoácidos idénticos.

Por otro lado, resulta interesante que en la región 362 pb del motivo involucrado en la exportación intracelular entre el núcleo y el citoplasma, caracterizada frecuentemente en

residuos ricos en L (leucina) del gen AtHsfA2 –MVDQMGFL en *Arabidopsis thaliana*, solo se detectó en la secuencia del transcriptoma de *Carica papaya* L, con remplazos en algunos aminoácidos -LVDCMGYL, esto revela una posible mutación que puede causar cambios en su estructura y función. Mientras que, la secuencia HsfA2 del cv. SunUp carece de la región de señal de exportación nuclear (NES). En tomate el gen SlHsfA2 es una proteína de transferencia con localización citoplasmática, dicho gen es una proteína fuertemente inducida por el estrés térmico, y a pesar de tener presente la señal de localización nuclear no se localiza en el núcleo a menos que se coexpresen con el gen HsfA1. Heerklotz *et al.* (2001), realizaron un estudio en el que inhibieron al receptor de exportación nuclear con Leptomomicina, el cual condujo a una localización nuclear casi completa sin la necesidad de HsfA1 como proteína auxiliar. Por lo tanto, se podría sugerir que la ausencia de la señal de exportación nuclear en papaya transgénica no afecta la localización celular nuclear y que puede ser apoyada por el dominio de oligomerización.

Respecto a, los miembros de clase B y C de *Carica papaya* L. (CpHsB1, CpHsB2b, CpHsB3 y CpHsC1) carecen de motivos AHA por lo que son incapaces de unirse al DNA de forma independiente. En *Arabidopsis*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum*, *Z. mays* y *Fagopyrum tataricum*, se describe en la región C-terminal un péptido con cuatro aminoácidos: -KLFQV- que se considera el núcleo de una secuencia de represión, existente ampliamente en otros factores de transcripción, como ABI3/VP1 y MYB/GRAS (Chen *et al.*, 2019; Ikeda y Ohme, 2009), el cual es identificado en nuestras secuencias B y C de estudio, sin embargo, la forma en que este péptido interactúa con otros dominios y cómo desempeña un papel de represión en el proceso de transcripción es complejo.

Del modo, para predecir la señal de localización y exportación nuclear, utilizamos la herramienta PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) para conocer la distribución celular de los 18 HSFs de *Carica papaya*, como lo indica Chung *et al.* (2013). En *Glycine max* mediante análisis de fusión con fluorescencia GFP en el vector binario de destino de Gateway, pK7FGW2 en tabaco, los genes GmHsf12, GmHsf28, GmHsf34, GmHsf35 y GmHsf47, correspondientes a la clase A y B estaban presentes en el núcleo, dichos resultados fueron confirmados por el autor con la herramienta PSORT. Nosotros encontramos que

los HSF del cv SunUp están presentes en el núcleo (confirmando que son factores de transcripción), y que concuerdan con un 68%-97% de identidad comparada con la secuencia de HSF de *A. thaliana*, *Zea mays* y *Solanum lycopersicum*. Se ha reportado, en *Arabidopsis thaliana* que los genes AtHsfA1a y AtHsA1b interactúan en el núcleo, el gen AtHsfA2 se encuentra en el citoplasma y que en un estado control, HSFs se pueden encontrar en el citoplasma, en un estado de estrés térmico en el núcleo y después del estrés (recuperación) regresan al citoplasma (Li *et al.*, 2010; Scharf *et al.*,1998). Sin embargo, para mayor comprensión de la regulación y la localización y estado de los genes de papaya sería importante realizar los análisis de orientación celular, antes y después de estrés térmico e hídrico, de la familia HSF.

2.5 CONCLUSIONES

- En este trabajo, se confirma el número de genes de la familia HSF en *Carica papaya* L. del genoma secuenciado del cv. transgénico SunUp. Se encontraron un número menor de secuencias HSFs (18) en *C. papaya* L. cv. SunUp en relación con *Arabidopsis thaliana* (21). Se encontraron 4 subclases adicionales en *Arabidopsis thaliana* (AtHsfA1e, AtHsfA4c, AtHsfA6a, AtHsfA7b), de las encontradas en *Carica papaya* cv. SunUp, esto probablemente por la reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20%, que presenta *Carica papaya* L. cv. SunUp en relación con *Arabidopsis thaliana*.
- Se identificaron en el transcriptoma de papaya, los genes homólogos HSF de *C. papaya* L. cv. SunUp y *Arabidopsis thaliana*, encontramos 11 genes en respuesta a estrés por déficit hídrico, presentando altos porcentajes de identidad de 93.6-100 %, los cuales se agruparon en 3 clases: A (6), B (4) y C (1) (HsfA1b, HsfA1d, HsfA2, HsfA4a, HsfA6b, HsfA9, HsfB1, HsfB2a, HsfB2b, HsfB3 y HsfC1).
- El alineamiento realizado entre las secuencias proteicas de *Carica papaya* L. cv. SunUp y *Carica papaya* cv. Maradol y silvestre en respuesta a déficit hídrico, presentaron los dominios característicos de la familia HSF reportados para *Arabidopsis thaliana*. La clase A de los genes HSF presentaron un dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD), un segundo dominio menos conservado dominio de oligomerización (OD), una señal de localización nuclear (NLS), una señal de exportación nuclear (NES) y un dominio de activación C-

terminal (AHA). Mientras que la clase B y C no presentó el motivo de activación (AHA). Se identificaron los péptidos KLF₂ responsables de la represión transcripcional de *Arabidopsis thaliana* en los genes CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1 en *Carica papaya* con 100% de aminoácidos idénticos.

- Encontramos las estructuras proteicas de cada grupo HsfA2, HSB3 y HsfC1 exhiben los motivos característicos para el reconocimiento específico y la unión de los HS palindrómicos, un motivo de tres hélices (H1, H2 y H3) y una hoja beta antiparalela de 4 cadenas (β 1, β 2, β 3, β 4) en *Carica papaya* L.
- La filogenia de la familia HSF de *Carica papaya* L. mostró la clasificación de genes en tres clases (A, B y C) divididos en dos clados principales y cuatro subclados, los miembros de la clase B forman parte de un clado subdividido en grupos distintos, los miembros de la clase A y C se agrupan en el segundo clado en forma parecida a lo que ocurre en *Arabidopsis thaliana*.
- El análisis predictivo de localización subcelular en todos los genes HSF valida que están restringidos en el núcleo, con un 68%-97% de identidad con otros HSF en *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* y *Solanum lycopersicum*, confirmando que efectivamente son factores de transcripción.

CAPÍTULO III CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO POR DÉFICIT HÍDRICO Y RECUPERACIÓN SOBRE LA FISIOLOGÍA Y LA EXPRESIÓN DE GENES HSF DE LA LÍNEA TIPO C7 *Carica papaya* L.

3.1 INTRODUCCIÓN

Carica papaya L. es la única especie dentro del género *Carica* y la especie más importante comercialmente dentro de la familia Caricaceae (ITIS, 2020). Ha sido ampliamente cultivada en regiones de tierras bajas tropicales y subtropicales por sus beneficios nutricionales y medicinales. Existe una variedad transgénica de *Carica papaya* SunUp autorizada para la comercialización, resistente a virus de la mancha anular, para aplicación comercial del mundo (Ming *et al.*, 2008). Sin embargo, la fruta de la papaya está sujeta a algunos otros problemas, como una corta vida en anaquel, susceptibilidad a estrés biótico y abiótico, lo que podría resultar en un alto porcentaje de pérdida de producción (Paull *et al.*, 1997).

Se estima que los diferentes tipos de estrés ambiental causan entre el 30% y el 50% de las pérdidas de cultivos en todo el mundo anualmente, entre las cuales la sequía es el factor número uno, debido a que causa pérdidas de hasta el 70% de producción (Zhu *et al.*, 2018). Algunas áreas donde se cultiva *C. papaya* L., en el país sufren actualmente sequía, en términos de producción a nivel nacional el estado con mayor producción de papaya de acuerdo a SIAP (2019): en Oaxaca el 85% de su territorio presenta sequía moderada, severa y extrema, en segundo lugar el estado de Colima presenta 41.6% de sequía moderada, en el ranking noveno y decimo el estado de Yucatán con 42.1% del territorio manifiesta sequía moderada y por último Tabasco con 36.4% sequía moderada, 13.7% severa y 12% sequía extrema (CONAGUA, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2015). Se ha reflejado la sensibilidad de *Carica papaya* L. a la sequía en una serie de modificaciones fisiológicas, que incluyen el marchitamiento de las hojas, reducción de la tasa fotosintética, reducción del crecimiento en un 50%, incidencia en la abscisión foliar, la estimulación del crecimiento de las raíces, los cambios en el contenido relativo de agua, la fuga electrolítica que interrumpen la homeostasis celular, entre otros (Romero, 2018; Girón, 2015; Mahouachi *et al.*, 2006).

Debido a todos estos factores, la papaya ha sido el foco de muchos estudios a nivel fisiológico y molecular, en este sentido, el mecanismo de mantenimiento celular mediante

el análisis de la expresión génica es un paso importante para dilucidar los mecanismos moleculares, comprender los mecanismos de adaptación para modular el balance hídrico, la regulación corriente arriba y corriente abajo en la transcripción de genes afectados y la acumulación de proteínas de estrés (Swindell *et al.*, 2007). Recientemente se han descrito una serie de genes complejos que responden a la sequía, algunos genes responden al estrés hídrico muy rápidamente, mientras que otros se inducen lentamente (Shinozaki y Yamaguchi, 1997).

Los HSFs en general son el componente principal de la respuesta al estrés por altas temperaturas, involucrados en la protección del aparato fotosintético y la estabilidad de las membranas (Chaves y Gutiérrez, 2017), además exhiben un papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas con su estructura modular básica y los elementos *cis* reguladores de choque térmico de sus genes diana siendo altamente conservados. Sin embargo, debido al tamaño de la familia de genes HSFs se ha sugerido que algunas clases de la familia han evolucionado para regular la respuesta a estrés por sequía (Bechtold *et al.*, 2013; Kotak *et al.*, 2004).

Recientemente, se han identificado que algunos miembros de la familia HSF son inducibles por estrés en sequía; la sobreexpresión del gen AtHsfA1b en *Arabidopsis thaliana* conduce positivamente en la productividad de las plantas, la tolerancia a la sequía y a la termotolerancia (Bechtold *et al.*, 2013). Los análisis de expresión en hojas de *Triticum aestivum*, en respuesta a estrés por sequía leve y severo mostró la participación de los genes TaHsfA1b, TaHsfA2d y TaHsfB1a con niveles de expresión altos durante el estrés (Xue *et al.*, 2013). El análisis de expresión en *Sesame indicum* L. de Dossa *et al.* (2016), propone que el gen HsfB3 como posible candidato para mejorar la tolerancia a la sequía, debido a sus altos valores de expresión, en la accesión tolerante LC164. Hu *et al.* (2015), realizaron un estudio en donde se muestran patrones de expresión temprana y tardía de los genes que participan en respuesta a sequía en *Fragaria vesca* (HsfA3a, HsfA4a, HsfC1a, HsfA5a, HsfA9a y HsfB1a). En un análisis de expresión basal de *Populus trichocarpa* encontró mayor expresión en tallo seguido de hoja del gen PtHsfA2 y en su evaluación de tres condiciones de estrés por privación de nitrógeno, sequía y choque térmico, el gen PtHsfA2 fue expresado con niveles más altos por choque térmico (Zhang *et al.*, 2015).

No existen reportes de la caracterización fisiológica de una línea nombrada C7 de *Carica papaya*, L. en respuesta a déficit hídrico (la cual se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular en la UBT del CICY) y no se ha encontrado reportes del rol de HSF en *Carica papaya* L. ni en esta línea C7, ni en el cv. Maradol y Silvestre en respuesta a cambios ambientales (déficit hídrico), de ahí la importancia del estudio de la línea C7 de papaya documentada en el presente capítulo.

Con el propósito de conocer el rol específico de los diferentes HSF en respuesta a déficit hídrico de *Carica papaya*, es necesario en este capítulo conocer la expresión de genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1 en diferentes genotipos (Maradol, Silvestre, y C7) de *Carica papaya*, por un método rápido y económico, como transcripción reversa reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) de hojas de plantas expuestas a diferentes puntos de estrés y en estado post estrés.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

El material vegetal (semillas) de la línea C7 fue proporcionado por el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Para germinar las semillas, se les dió un tratamiento pre-germinativo, para ello se utilizó el protocolo reportado por Muñozcano y Martínez (2008), modificado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular. Después de que la radícula midiera más de 0.5 mm se pasó a la siembra en charolas de germinación que consistió en colocar cada semilla a 1 cm de profundidad en charolas de plástico (35 cavidades) utilizando como sustrato Peat moss (Sunshine). El riego en la etapa de germinación consistió en 10 mL diario, después, 20 mL cada dos días hasta cumplir los primeros 25 d.

3.2.2 Aclimatación de plantas de *Carica papaya* L.

A los 25 días de edad fisiológica, las plantas fueron trasplantadas a bolsas negras de tipo injerto, con un sustrato 1:1 de Peat moss (Sunshine) y tierra roja. En donde se mantuvo el riego constante cada segundo día de 40 mL. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas, la temperatura promedio de 30 ± 2 °C y un flujo de fotones de $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante marzo-julio 2018. Además de la fertilización orgánica, se complementó la fertilización con una solución nutritiva de (Bayfolan® Forte líquido, Bayer) (1 mL L^{-1}) dos veces por semana.

3.2.3 Caracterización del estrés por déficit hídrico

Para encontrar el punto de estrés hídrico se utilizaron plantas de 5 meses de edad, en el cual se evaluaron tres tiempos de exposición de estrés. Las plantas se distribuyeron de manera aleatoria, en la cual se usaron tres réplicas, en total para cada grupo se destinaron 6 plantas. El grupo control (I) se mantuvo en condiciones normales de riego. El grupo II fue el grupo inicial (Tiempo 0). Los grupos (III, IV, V) fueron sometidos a diferentes tiempos de estrés sin riego (7, 14 y 21 d, respectivamente), mientras que los grupos (VI y VII), se sometieron a una etapa de re-riego, durante 1 y 7 días (22 y 29 d, respectivamente). En cada uno de los grupos, se midieron parámetros fisiológicos determinantes como; potencial hídrico (Ψ_H), fluorescencia de clorofila (Fv/Fm), fotosíntesis (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),

conductancia estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), CO₂ intercelular (C_i , μmol CO₂ mol⁻¹) y transpiración (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹) para caracterizar el estado de estrés de las plantas.

3.3 Análisis fisiológicos

3.3.1 Potencial hídrico (MPa)

Para determinar el potencial hídrico en hojas, se seleccionaron 3 muestras de tejido de la hoja más joven completamente expandidas de cada planta, de las cuales se obtuvieron los subsecuentes análisis fisiológicos. Para determinar el potencial hídrico (Ψ_H) en hojas se utilizó cámaras psicrométricas C-52 conectadas a un microvoltímetro de punto de rocío Wescor HR-33T (Wescor Inc., Logan, UT, EE. UU.).

3.3.2 Fluorescencia de clorofila

Para analizar el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, se determinó el cociente de fluorescencia variable (F_v) sobre fluorescencia máxima (F_m), F_v/F_m ; que se ha definido como una medida de la eficiencia fotoquímica no destructiva y como un criterio de respuesta y cuantificación del daño o alteración, indicando el nivel de estrés al que se encuentra expuesta una planta (Jiménez *et al.*, 2015; Critchley y Smillie, 1981). Estas mediciones se realizaron utilizando un fluorómetro de clorofila (FMS 2 Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). Consistió en adaptar las hojas seleccionadas en cada planta a la obscuridad por un período de 30 min utilizando un clip especial para hoja (leaf clip). Posteriormente estas hojas se expusieron a un pulso de luz roja saturante (650 nm, 3000 μmol m⁻²s⁻¹) durante 2 segundos.

3.3.3 Fotosíntesis (Pn)

La tasa fotosintética de las hojas se determinó con un analizador de gases en el espectro infrarojo (IRGA, por sus siglas en inglés) portátil LICOR (LI 6400, Lincoln, Nebraska, USA) con cámara para hoja de 6.00 cm² con una relación de estomas en la parte adaxial/abaxial de 0.1. Las mediciones se llevaron a cabo bajo un flujo constante de aire de 350 μmol s⁻¹ y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 1000 μmol s⁻¹. Para las mediciones se colocó la hoja en la cámara y utilizando el programa pre-cargado en el equipo se esperaron segundos para estabilizar la medición inicial y obtener las lecturas de: fotosíntesis (P_n , μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), conductancia estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), CO₂ intercelular (C_i , μmol CO₂ mol⁻¹) y transpiración (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹).

3.4 Análisis molecular

3.4.1 Extracción de ácidos nucleicos

Se consideró hacer la extracción de ácidos nucleicos de dos genotipos: Maradol y silvestre de tejido de hoja de un estudio previo al déficit hídrico realizado por (Girón, 2015). Y el RNA total de hojas de plantas de cada uno de los tiempos de exposición de estrés de la línea tipo C7, se aisló mediante el protocolo previamente establecido en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular de la Unidad de Biotecnología, bajo los fundamentos de CTAB. Posteriormente, se eliminaron restos de DNA genómico con el protocolo DNAasa I de rutina, publicado por TURBO DNA-free™, con algunas modificaciones, Invitrogen. La calidad de las muestras de RNA se verificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ OneC (Thermo Scientific) se manejó un valor de absorbancia obtenido de la razón de las longitudes de onda de A260/A280 y se verificó en geles de agarosa al 1.5%, las condiciones de corrida fueron 90 V, 30 min y 400 mA, para confirmar la integridad del RNA extraído. Las extracciones se realizaron con tres repeticiones por tiempo de estrés y fue almacenado a -80 °C.

3.4.2 Síntesis de DNAc

La síntesis de DNAc se efectuó a partir de 500 ng de RNA total de cada muestra, la cual consistió en dos reacciones; la primera, 2 µL de la reacción compuesta por 1 µL de dNTPs (10 mM) y 1 µL de random primer, los tubos fueron agitadas suavemente y se incubaron a 70 °C durante 5 min. La segunda reacción radicó en añadir 9 µL de la mezcla de reacción compuesta por 2.0 µL de Buffer 5x First, 4.0 µL MgCl₂ (25 mM), 2.0 µL DTT (0.1 M), 1.0 µL transcriptasa reversa (Invitrogen). Posteriormente, los tubos se incubaron a 25 °C por 5 min y 42 °C por 1.45 min, 70 °C durante 15 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

3.4.3 Diseño de oligonucleótidos de genes CpHSF de *Carica papaya* L.

El diseño de los oligonucleótidos de los genes para el análisis de expresión por RT-PCR cuantitativo, se realizó por pares a partir de las secuencias homólogas de genes de *Carica papaya* L. de los genes CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB3 y CpHsfC1 con el programa Primer Express V3.0, utilizando los siguientes criterios de selección: los oligonucleótidos se diseñaron procurando tener una longitud no mayor a 22 pb, Temperatura mayor a 50 °C y un porcentaje de GC del 50%. Se buscó un tamaño de

amplicón entre 100 a 120 pb recomendable para la alta eficiencia y sin formación de dímeros. Los oligonucleótidos CpHsfA1a, CpHsfA2, CpHsfB1 y CpHsfB2b fueron previamente diseñados por Alcocer (2013), para condiciones de RT-PCR cualitativo. El oligonucleótido de referencia (CpEF1 α) fue previamente diseñado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

3.4.4 Validación y análisis de expresión por RT-PCR

Para la validación de los genes y expresión en punto final, se realizó una mezcla en la cual contenía; 5 μ L de Buffer 10x PCR, 2.0 μ L MgCl₂ (50 mM), 0.8 μ L de dNTPs, 1 μ L de oligonucleótido sentido, 1 μ L de oligonucleótido antisentido, 0.2 μ L de Taq Polimerasa (Invitrogen), 1.5 μ L de DNAc y agua grado molecular necesaria para aforar a un volumen de 50 μ L. Las condiciones de PCR para la búsqueda de la temperatura de amplificación ideal, se programaron en termocicladora (Veriti®), las cuales fueron las siguientes: 95 °C durante 3 min para la desnaturalización inicial, seguido de 29 ciclos con desnaturalización a 95 °C durante 30 s, la alineación a (58,60,62 y 64 °C durante 1 min), la extensión a 72 °C durante 2 min, y la etapa de extensión final a 72 °C durante 5 min. Adicionalmente, se utilizó un gen marcador constitutivo (CpEF1 α) diseñado para *Carica papaya* L. Para valorar la extensión de los oligonucleótidos, se llevó a cabo la observación de la banda resultante mediante la preparación del gel de agarosa a una concentración de 2%, teñido con Bromuro de Etidio. Las condiciones de corrida fueron 75 V, 60 min y 400 mA. Para ello, se utilizó un marcador molecular de 50 pb (Promega).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico

En Figura 3.1, se observan los cambios morfológicos, fisiológicos y de crecimiento, en respuesta a déficit hídrico en una nueva línea de *Carica papaya* L. tipo C7; como son: pérdida de clorofila (clorosis), reducción de crecimiento, abscisión de hojas, adelgazamiento de tallo y reducción de turgencia. Estos cambios fueron notorios al día 7 sin riego y significativos después de 21 d sin riego. Respecto a los tiempos de post estrés (recuperación de riego), al día 7 se observó recuperación de pigmentos de clorofila y crecimiento de nuevos brotes. Observaciones interesantes para estudiar la respuesta mediante parámetros fisiológicos.

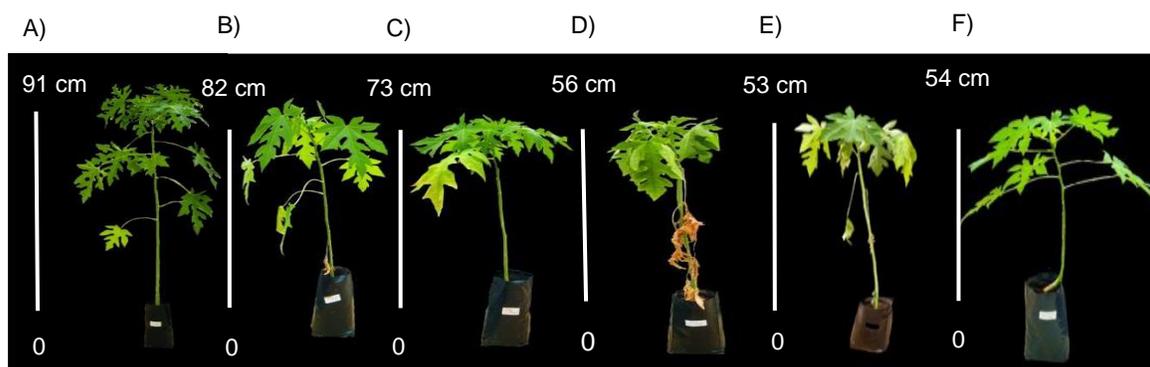


Figura 3.1 Plantas de *C. papaya* L. expuestas a diferentes tiempos de estrés hídrico en plantas de cinco meses de edad de la línea tipo C7 de *Carica papaya* L. A) Plantas control, B) Plantas sin riego por 7 días, C) Plantas sin riego por 14 días, D) Plantas sin riego por 21 días. Posterior al déficit hídrico, dos tratamientos de recuperación del riego: E) Plantas después de 1 día con riego y F) Plantas después de 7 días con riego.

3.5.2 Potencial Hídrico

En nuestros resultados observamos en el tiempo inicial (control), valores en promedio constantes de -1.12 MPa. Valores < -1.0 MPa, que indican plantas con un estatus hídrico adecuado y en consecuencia plantas no estresadas por déficit hídrico. Respecto a los tratamientos de estrés, en nuestro primer tratamiento de estrés a los 7 días se observó una ligera caída en el potencial hídrico de -1.26 MPa, encontramos diferencias significativas a partir de los 14 días sin riego, las plantas mostraron un potencial de -1.52 MPa y al día 21 tratamiento con máximo estrés llegó a -1.70 MPa (Figura 3.2). Datos en la literatura indican que el punto de marchitamiento permanente llega a valores de -1.5 MPa en otras especies, de acuerdo con nuestros resultados en papaya sugerimos que el valor del punto de marchitez es mayor de -1.70 MPa. Observamos que las plantas a los 7 días de reintegrar el riego fueron capaces de recuperar su estatus hídrico al mismo nivel que las plantas en tiempo control. Estos resultados nos indican que la línea de tipo C7 es capaz de recuperar su potencial hídrico a pesar de haber alcanzado un potencial hídrico menor a -1.7 MPa en el momento de máximo estrés.

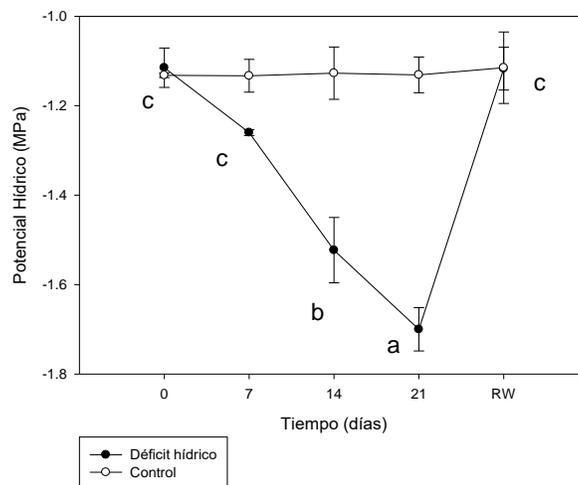


Figura 3.2 Potencial hídrico de plantas de la línea C7 de *Carica papaya* L. en condiciones control (0); en respuesta a déficit hídrico (7, 14, 21 d) sin riego, y un tiempo de recuperación 7 días (28 d). Las plantas control se mantuvieron en condiciones normales de riego. Las barras indican la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5.3 Fluorescencia de clorofila

En respuesta al parámetro fisiológico de fluorescencia de clorofila, se observó que las plantas control presentaron valores entre 0.80 y 0.81, estos valores indican que el fotosistema II, está en su uso eficiente de energía de excitación. Por el contrario, en las plantas expuestas a los tratamientos de estrés, el valor disminuyó a partir de los 7 días de estrés, alcanzando un valor de 0.74 y se mantuvo constante en el resto del experimento, además, se observó que la línea C7 presentó una ligera alteración en su fotosistema II, pero no fue significativa, por lo que el estrés no fue suficiente para provocar un daño en la cadena transportadora de electrones o en los centros de reacción. De hecho, las plantas de este genotipo fueron capaces de regresar a valores de 0.78 después de volver a aplicar el riego durante 7 días (RW), lo que indica que fueron capaces de recuperar la energía de excitación en el proceso fotoquímico (Figura 3.3).

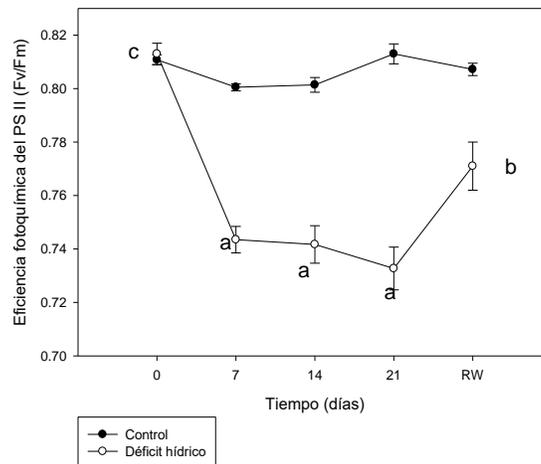


Figura 3.3 Fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) de la línea de tipo C7 de *Carica papaya* L. en condiciones control (0), expuestas a diferentes días de estrés por déficit hídrico (7, 14, 21 d), y un tratamiento de recuperación, 7 días (28 d, RW). Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego durante todo el tratamiento. Las barras indican la media +/- la desviación estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5.4 Fotosíntesis (Pn), Conductancia Estomática (g_s), CO₂ Intercelular (Ci) y Transpiración (E).

Para conocer si las plantas en los tratamientos de estrés por déficit hídrico presentaban alguna afectación en la tasa fotosintética en los tratamientos de estrés más severos por déficit hídrico, se realizó el estudio fotosintético en cada uno de ellos, encontrando que las plantas del tratamiento control presentaron valores de 6 a 8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por el contrario, plantas expuestas a estrés por déficit hídrico presentaron valores de 3.06 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 7 días después de iniciado el tratamiento de estrés. Mas aún, después de 21 d sin riego, se encontró una caída significativa en las tasas fotosintéticas (0.85 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Es interesante que la línea C7, es capaz de recuperar su tasa fotosintética a los 7 días de restauración del riego (RW), presentando valores cercanos al control de 6.15 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 3.4A).

Respecto a la conductancia estomática, el tratamiento control presentó valores de 0.41 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por el contrario, plantas expuestas por 21 d a estrés por déficit hídrico, presentaron valores de g_s tan bajos como 0.0162 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Cuando las plantas previamente estresadas, se les reincorporó el riego, la conductancia estomática aumentó hasta un 50 % alcanzando valores de 0.26 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 3.4B).

En el caso del CO₂ intercelular (Ci) en el tiempo 0, las plantas control presentaron un valor de 332 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Una vez eliminado el riego, el Ci disminuyó a 275 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ después de 7 días. Mientras que, a los 21 d, se obtuvo el valor más bajo de Ci de 271 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Una vez que se reintegró el riego a estas plantas previamente estresadas, el Ci incrementó progresivamente durante la semana de recuperación, hasta alcanzar valores de 314 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (Figura 3.4C).

Por último, las plantas presentaron una tasa de transpiración, en el tiempo 0 de 6.5 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se observó que la línea de tipo C7 tuvo una disminución progresiva y significativa en todos los tiempos de estrés, sin embargo, en el tiempo 21 presentó los valores más bajos de transpiración de 0.6 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Una vez reincorporado el riego, los valores de transpiración se recuperaron, alcanzando valores de 5.28 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ después de 1 semana de reincorporar el riego (Figura 3.4D).

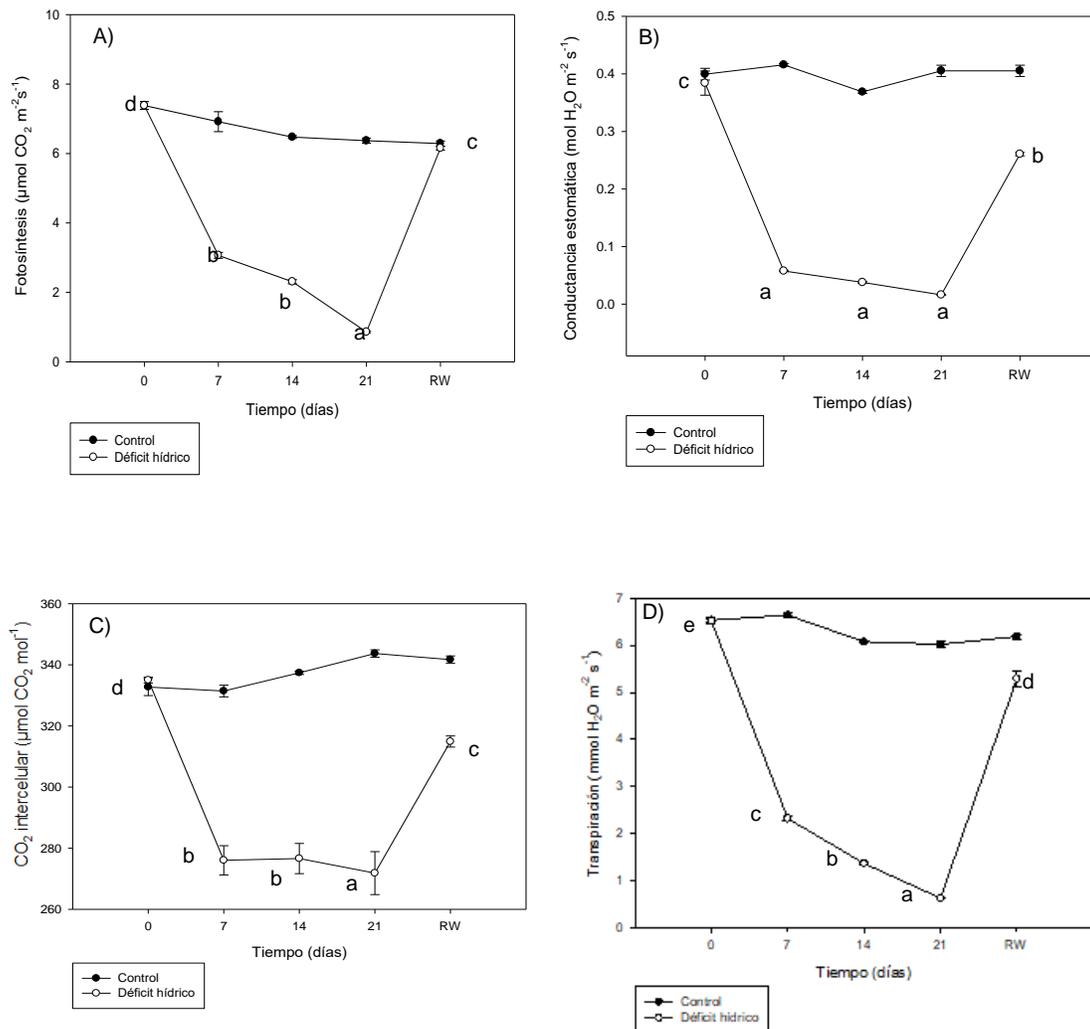


Figura 3.4 Intercambio de gases en plantas de tipo C7 de *Carica papaya* L. en condiciones control (0), expuestas a diferentes tiempos de estrés por déficit hídrico (7, 14, 21 d), y un tratamiento de recuperación: 7 días (28 d, RW). Las plantas control se mantuvieron bajo condiciones normales de riego durante todo el tratamiento. A) Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), B) Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C) CO_2 intercelular ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) y D) Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las barras indican la media \pm desviación estándar ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5.5 Análisis de pureza de RNA

Se muestran los índices de pureza del RNA del tejido hoja de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. Maradol y Silvestre en condiciones control (T0) y a los diferentes tiempos de exposición a estrés por déficit hídrico control, día 7 (T7) y día 14 (T14) y postestrés (recuperación) día 15 (T15_{RP}) y día 21 (T21_{RP}) (Cuadro 3.1 A y B). Y la línea de *Carica papaya* tipo C7: control T0, día 7 (T7), día 14 (T14), más un tratamiento de estrés hídrico (día 21, T21) y dos tiempos de recuperación día 22 (T22_{RP}) y día 28 (T28_{RP}), se muestra en el cuadro 3.1 C. De acuerdo con Desjardins y Conklin (2010), el ácido nucleico RNA puro típicamente produce una relación de absorbancia 260/280 de ~2.0 y, la segunda medida de pureza es una longitud de onda A260/230, que indica valores para un ácido nucleico, de alta pureza, comúnmente en el rango de 1.8-2.2. Si la proporción es apreciablemente más baja, en cualquier caso, puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes. Estos índices son importantes para lograr una estimación precisa para la síntesis de DNAC así mismo para evaluar la calidad de las muestras y confiabilidad de los resultados de expresión génica (Remans *et al.*, 2014). Nuestros extractos después de ser tratados con tratamiento DNAasa I (TURBO DNA-free™) muestran en efecto índices de pureza óptimos en los diferentes tiempos de exposición a estrés, con valores promedio de 2.06 de A260/280 y de 2.08 de A260/230, con rendimiento inicial (tiempo 0), de 106 µg RNA gPF⁻¹ en el genotipo Maradol, mientras que en el genotipo Silvestre fue de 2.08 de A260/280 y A260/230 de 2.10, con rendimiento en hojas control de 202 µg RNA gPF⁻¹. Por último, la línea de *Carica papaya* tipo C7 presentó valores de 2.10 de A260/280 y A260/230 de 1.93 con rendimiento inicial de 44.2 µg RNA gPF⁻¹. Es decir, los valores obtenidos de la cuantificación de RNA (de calidad y cantidad) de los tres genotipos fueron adecuados para continuar los niveles de expresión.

En el cuadro 3.1 se observa que el genotipo Silvestre presentó mayor rendimiento de 202 µg RNA gPF⁻¹ que el cv. Maradol de 106 µg RNA gPF⁻¹ y la línea C7 con rendimiento de 44 µg RNA gPF⁻¹. Conforme aumentaron los días de estrés los rendimientos de RNA fueron a la baja: a los 7 días sin riego el rendimiento del cv. Maradol disminuyó de 106 a 87 µg RNA gPF⁻¹, de igual modo el rendimiento del genotipo Silvestre disminuyó a partir de los 7 días de estrés hídrico. Ambos genotipos a los 21 días de reincorporar el riego, el rendimiento de RNA fue mayor del rendimiento inicial, con 146 µg RNA gPF⁻¹ en el cv

Maradol y 212 μg RNA gPF⁻¹ en el genotipo silvestre. En cambio, el rendimiento de RNA en la línea C7, en cada uno de los tiempos de estrés y recuperación fue menor a la inicial. Posteriormente, en la Figura 3.5, para detectar la calidad del RNA se observa la integridad de las subunidades de RNA ribosomal, se visualizaron las bandas en geles de agarosa para mostrar la confiabilidad del RNA mediante el análisis de las bandas ribosómicas 28S y 18S; la ausencia individual o dual sugiere la degradación del RNA.

Cuadro 3.1 Calidad y rendimiento ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$) de RNA extraído de tejido de hojas de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. expuestas a diferentes tiempos de estrés por déficit hídrico; control (T0), día 7 (T7), día 14 (T14) y dos tiempos de recuperación día 15 (T15_{RP}), día 21 (T21_{RP}). **A)** Maradol, **B)** Silvestre. Respecto a la línea C7, se consideró un tratamiento más de estrés; control, control (T0), día 7 (T7), día 14 (T14), día 21 (T21), y dos tiempos de recuperación día 22 (T22_{RP}) y día 28 (T28_{RP}). **C)** Línea C7.

A)

Maradol	ng/ μL	A260/A280	A230/A280	Rendimiento $\mu\text{gRNA gP F}^{-1}$
T0	707.1	2.01	1.93	106.07
T7	609.7	2.09	2.20	87.10
T14	766.4	1.99	1.93	102.19
T15 _{RP}	389.6	2.11	2.13	57.58
T21 _{RP}	1145.7	2.10	2.22	146.8

B)

Silvestre	ng/ μL	A260/A280	A230/A280	Rendimiento $\mu\text{gRNA gPF}^{-1}$
T0	1450	2.11	2.16	202.3
T7	1082.8	2.11	2.20	141.2
T14	374.9	1.99	1.82	49.9
T15 _{RP}	997.1	2.11	2.23	147.3
T21 _{RP}	1458.8	2.12	2.12	212.4

C)

C7	ng/μL	A260/ A280	A230/A28 0	Rendimiento μgRNA gPF ⁻¹
T0	294.8	2.13	1.86	44.2
T7	228.8	2.0	1.94	33.9
T14	325.1	2.12	1.94	40.4
T21	317.2	2.15	2.17	43.2
T22 _{RP}	180	2.13	1.84	25.4
T28 _{RP}	192.9	2.10	1.83	28.5

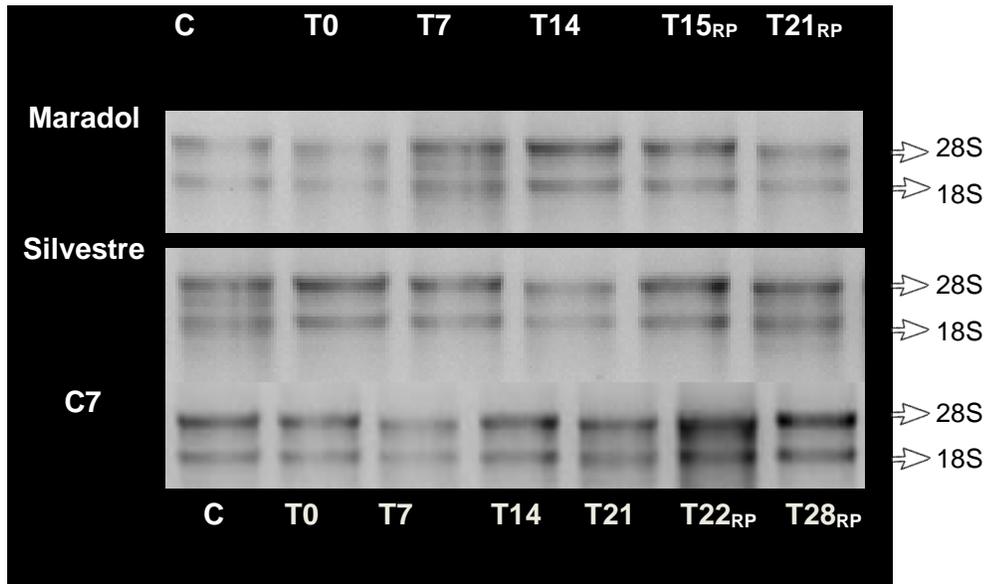


Figura 3.5 Unidades ribosomales (28S y 18S) de RNA extraído de tejido hoja de plantas jóvenes de *C. papaya* L. Maradol y Silvestre (control C, tiempo 0, T0; tiempo 7, T7, tiempo 14, T14, y dos tiempos de recuperación: 1 día, T15_{RP} y 7 días T21_{RP}). Línea C7 (control C, tiempo 0, T0; tiempo 7, T7, tiempo 14, T14, tiempo 21, T21 y dos tiempos de recuperación, 1 día T22_{RP} y 7 días T28_{RP}). Electroforesis de 90V, 400 A durante 30 minutos en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de Etidio.

3.5.6 Validación de oligonucleótidos HSF

Se diseñaron y validaron los oligonucleótidos para los genes CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfB3 y CpHsfC1 (análisis filogenético en el capítulo II), así mismo, se analizaron los oligos CpHsfA1a, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b realizados por Alcocer (2013), y se uso como gen constitutivo (housekeeping) el CpEF1 α , diseñado específicamente para *C. papaya* L. en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular; se analizaron mediante la técnica de RT-PCR punto final. Para determinar la temperatura óptima de amplificación y visualizar una sola banda específica con el tamaño esperado de amplicón; se prosigió a

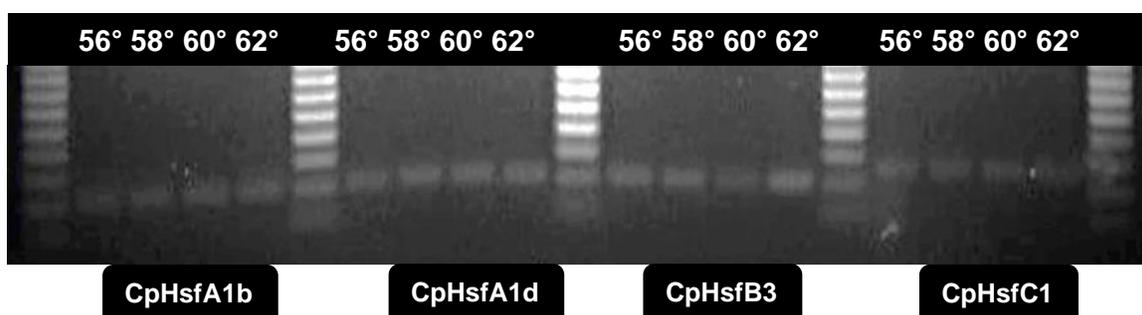


Figura 3.6 Se observa la amplificación de los genes CpHsfA1b (120 pb), CpHsfA1d (100 pb), CpHsfB3 (100 pb) y CpHsfC1 (120 pb), en hojas de plantas en estrés de 14 días de *C. papaya* L. Maradol. Geles de agarosa al 2% de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio. El marcador de peso utilizado fue 1Kb plus. En corridas de 75V, 400 A y 55 minutos. Los recuadros superiores indican las temperaturas de amplificación de cada gen analizadas para cada caso (de izquierda a derecha): 56, 58, 60 y 62 °C.

realizar un análisis de RT-PCR de gradiente (56, 58, 60 y 62 °C), el cual se muestra en la Figura 3.6 se observa la amplificación en geles de agarosa al 2% de los genes CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfB3 y CpHsfC1 de tejido de hoja de plantas estresadas por déficit hídrico (14 días) de *C. papaya* L. cv. Maradol. Se observó en todos los genes evaluados una sola banda clara, sin arrastre de producto o formación de dímeros. El tamaño de fragmentos esperados correspondientes a cada gen de interés y su temperatura (T_m) de amplificación seleccionada, se presenta en el Cuadro 3.2. En todos los oligonucleótidos se obtuvo una adecuada amplificación a una T_m entre 59 y 60 °C. Una temperatura de fusión elevada ayuda a reducir la probabilidad de formar dímeros en la técnica RTq-PCR correspondiente al capítulo IV de esta tesis.

Cuadro 3.2 Diseño y análisis de resultados de la visualización de la banda correspondiente a la expresión de los genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3.y CpHsfC1 en gel de agarosa respecto al amplicón esperado y temperatura seleccionada para los siguientes análisis. LFVM: Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Gen	Tm °C	Amplicon (pb)
CpHsfA1a	59	254
CpHsfA1b	60	120
CpHsfA1b	59	204
CpHsfA1d	59	100
CpHsfA2	59	208
CpHsfA2	60	119
CpHsfB1	59	193
CpHsfB2b	59	202
CpHsfB3	59	100
CpHsfC1	59	120
CpEF1 α	59	200

3.5.7 Expresión de genes HSF en plantas jóvenes de *Carica papaya* L. expuestas a un estrés por déficit hídrico.

En esta sección se diseñaron experimentos para contestar la siguiente pregunta de investigación: ¿Los genes HSF son genes inducibles por estrés hídrico en diferentes genotipos de *Carica papaya*?

Se evaluaron los 8 genes (CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1), en respuesta a déficit hídrico en tres genotipos de *Carica papaya*: 1) comercial Maradol, 2) la línea C7, y 3) un genotipo silvestre. Encontramos cuatro genes (CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfB1 y CpHsfC1) que se expresaron de manera constitutiva, en los tratamientos control como en los diferentes tiempos de estrés, se observan bandas de la misma intensidad, es decir, se expresan constitutivamente en los tres genotipos evaluados.

Por lo contrario, resulta interesante que los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3, están involucrados en la respuesta al déficit hídrico. Ya que bajo condiciones de riego estos genes no se expresan en ninguno de los 3 genotipos. Sin embargo, después de 7 d de estar expuestas a estrés por déficit hídrico se induce la expresión de estos genes (la intensidad de las bandas aumenta considerablemente), en especial a los 14 días sin riego, en cv. Maradol y Silvestre. Una vez reintegrado el riego, los niveles de expresión regresaron a intensidades de banda similares del tratamiento control. Respecto a la línea C7, el patrón fue similar, sin embargo, la expresión comenzó en el tiempo 7 y la mayor expresión se observa a los 14 y 21 días sin riego. Una vez reintegrado el riego la expresión de estos genes disminuye a los 22 y 28 d (la intensidad de la banda fue menor). La respuesta de estos genes como posible mecanismo para proteger células y tejidos contra exposiciones a estrés hídrico en papaya comercial es rápida (expresión al día 7 de tratamiento), diferente a lo que pasa en el genotipo silvestre. En el genotipo silvestre, la respuesta de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 se mantiene alta durante la etapa máxima de estrés, de 14 días (sin riego), sugiriendo su importancia durante la fase de máximo estrés, para mantener las estructuras y sistemas celulares trabajando en estrés hídrico lo que podría indicar que dichos genes están involucrados en el genotipo silvestre como mecanismo de tolerancia (Figura 3.7).

Observamos, por intensidad de banda, que un miembro de la clase B reportado como represor transcripcional y que regula negativamente la expresión de los genes AtHsfA2, AtHsfA7a, AtHsfB1 y AtHsfB2b y algunas HSP en *Arabidopsis thaliana*, los genes HsfB1 y HsfB2b, son necesarios para promover la actividad del grupo A1 en condiciones de estrés térmico y la termotolerancia (Ikeda *et al.*, 2013). En *Carica papaya* L. el gen CpHsfB3 tiene un papel fundamental para la activación de otros genes en la respuesta a la sequía en los tres genotipos de *Carica papaya* L., como se menciona en el párrafo anterior. Por otro lado, la expresión del gen CpHsfB2b en los tres genotipos fue muy baja, en todos los tiempos de exposición de estrés y post estrés. Por lo que no parece estar tan involucrado a estrés por déficit hídrico. Respecto al gen CpHsfC1, su función en otros cultivos de interés comercial sigue siendo desconocido, en los tres genotipos de *Carica papaya* L. encontramos expresión constitutiva durante los diferentes tiempos de estrés y post estrés hídrico. Estos resultados destacan el interés de corroborar estas tendencias en genes inducibles por estrés hídrico utilizando la técnica de RTq-PCR que se presentan en el siguiente capítulo de esta tesis.

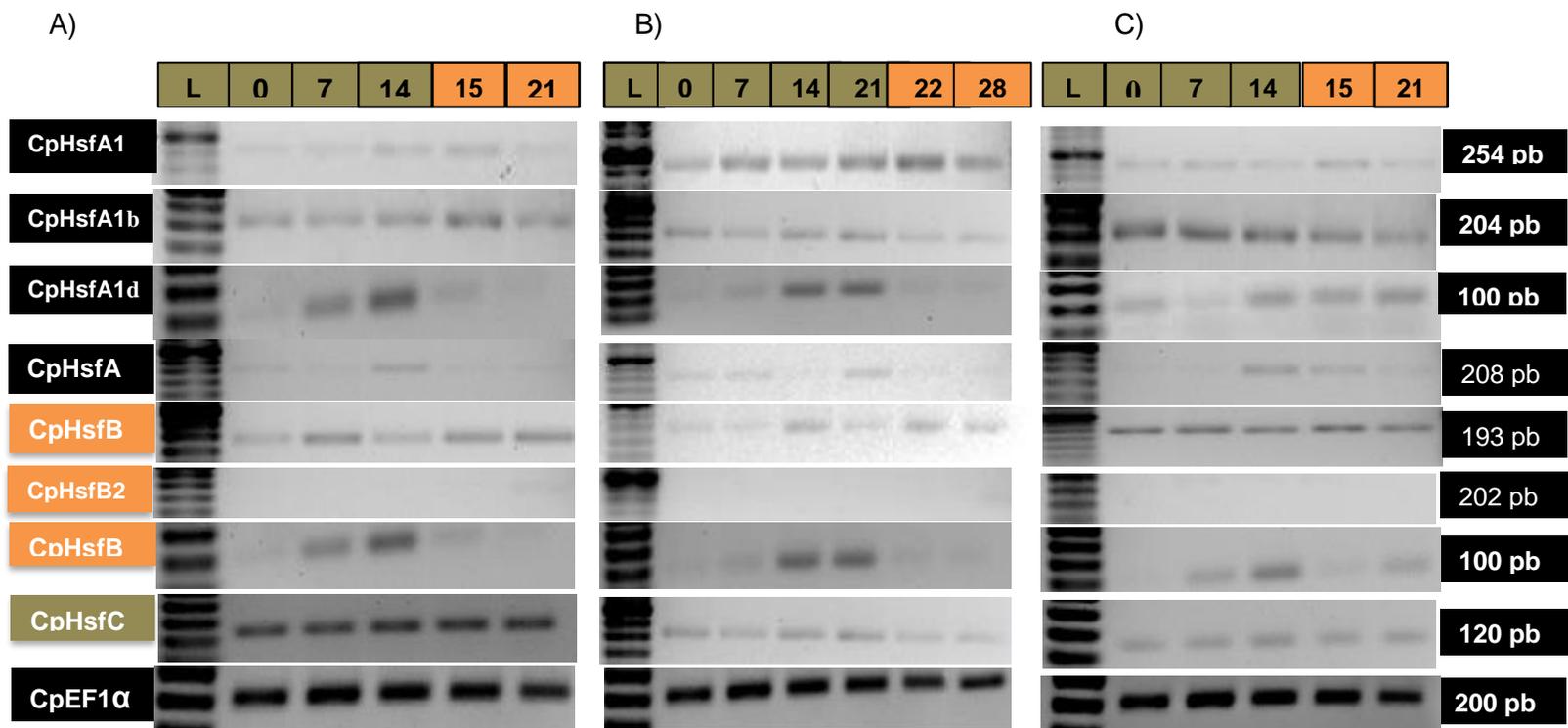


Figura 3.7 Expresión de 9 genes en tejido de hojas de plantas jóvenes de *C. papaya* L. A) Maradol, control: 0; sin riego: tiempo 7 d, tiempo 14 d; y dos tiempos de recuperación (aplicación de riego), 1 (15) y 7 días (21). B) línea de tipo C7 (control: tiempo 0; sin riego: tiempo 7 d, tiempo 14 d, tiempo 21 d; y, dos tiempos de recuperación; 1 (22) y 7 días (28). C) Silvestre (control: 0; sin riego: tiempo 7 d, tiempo 14 d; y dos tiempos de recuperación (aplicación de riego), 1 (15) y 7 días (21). Los recuadros superiores indican el tiempo (días, d) de exposición a déficit hídrico. Los recuadros del margen izquierdo indican el nombre de cada gen y los números el margen derecho indica el tamaño de banda esperado en pb. El gen utilizado como control fue CpEF1α. Geles de agarosa al 2% de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio. El marcador de peso utilizado fue de 50 pb (L), en corridas de 75V, 400 A y 55 minutos.

3.6 DISCUSIÓN

3.6.1 Cambios morfológicos y fisiológicos

Las plantas de *Carica papaya* L. línea C7, expuestas a estrés por déficit hídrico mostraron cambios en su apariencia, tales como clorosis y abscisión de hojas. Esto pudo deberse a la disminución en la turgencia al disminuir el potencial hídrico de la planta. Esta disminución pudo afectar la fluorescencia de clorofila y parámetros como fotosíntesis. La conductancia estomática y la transpiración también disminuyeron conforme el tiempo de estrés por déficit hídrico aumento. Después de la recuperación (reincorporación del riego), la fotosíntesis y la fluorescencia de clorofila se recuperaron a valores similares a los de las plantas control.

Tal como lo muestran, dos análisis previos en nuestro grupo de trabajo, en papaya Maradol y Silvestre (Romero, 2018; Girón, 2015), dentro de los parámetros fisiológicos más importantes esta la determinación del potencial hídrico y el contenido relativo de agua, para caracterizar el estado hídrico de la planta. También por ser el agua, el componente mayoritario en la planta, ya que permite la distribución de nutrientes, el crecimiento de las plantas y mantiene la turgencia en hojas, raíces y otros órganos. En nuestros resultados observamos que la línea tipo C7 tuvo un potencial hídrico inicial (control), con valores promedio constantes de -1.12 MPa. Valores similares a lo reportado en plantas control de *Carica papaya* cv. Maradol y Silvestre fueron observados desde -0.5 a -1.0 MPa; y en *Carica papaya* cv. Baixinho de Santa Amalia donde se encontraron valores de -0.7 a -0.8 MPa como indicativo de plantas con un riego adecuado (Mahouachi *et al.*, 2006). Respecto a los tratamientos de estrés, el máximo día de estrés (21 d), las plantas mostraron el potencial menor con -1.70 MPa. La literatura señala valores de -1.5 MPa como el punto de marchitamiento permanente a partir del cual, las plantas no recuperan la turgencia, nuestro resultado rebasa el valor reportado, con -1.70 MPa en plantas de la línea C7, como lo observado por Romero (2018), quien en papaya cv. Maradol encontró valores menores de -2.34 MPa y en papaya Silvestre valores de -1.90 MPa en hoja, por lo que se podría clasificar a papaya, como una especie tolerante, afirmación que ha sido respaldada por Girón (2015), en nuestro laboratorio y por Mahouachi *et al.* (2006), debido a que plantas de papaya sometidas a estrés hídrico mostraron una tendencia a acumular iones como K^+ , Na^+ y Cl^- , y que contribuyen al ajuste osmótico y a la tolerancia del estrés hídrico.

A pesar de que las plantas de la línea C7 presentaron valores menores de Ψ_H a los 7 y 14 días sin riego, a los 21 días, alcanzaron el valor de -1.70 MPa, indicando un grado de pérdida de agua. Las plantas tipo C7 que se encontraban en tratamientos de estrés, mediante el análisis de Fv/Fm que indica la estabilidad del aparato fotosintético II, a través de la determinación de uno de los parámetros relacionados con la velocidad de transporte de electrones, éste, disminuyó de 0.80 a 0.74 después de 7 días sin riego, sin diferencia significativa a los 14 y 21 días de estrés. Dicho parámetro, se ha realizado en un gran número de especies manteniendo un valor cercano a 0.832 si el PS II esta íntegro, que concuerda con nuestros valores iniciales de 0.80 y 0.81. La disminución de la pendiente de Fv/Fm es un criterio valioso para conocer el daño en plantas que están expuestas a estrés, en este caso por déficit hídrico.

Nuestros resultados concuerdan con los publicados por Girón (2015), durante sus tratamientos de 7 y 14 días sin riego, el comportamiento de Fv/Fm en papaya cv. Maradol y Silvestre, disminuyó conforme aumentaron los tiempos de exposición, pero la disminución no fue significativa. Estos resultados también coinciden con lo reportado por Lu y Zhang (1998), en plantas de trigo y por Alcocer (2013), en papaya cv. Maradol en respuesta a estrés térmico, por lo que es importante considerar otros parámetros que puedan dar más información de la respuesta fotoquímica del PSII, además incluir otro parámetro más sensible a estrés, como fuga de electrolitos que se indica en el capítulo IV. Debido a los valores de recuperación muy cercanos al control en papaya de la línea C7 de la energía de excitación en el proceso fotoquímico, se podría pensar que tiene un grado de tolerancia de estrés por déficit hídrico.

Mientras que la tasa de transporte de electrones en plantas de la línea tipo C7 no se vio afectada como consecuencia del estrés hídrico, si se observó una reducción significativa a los 21 días de estrés, en la capacidad fotosintética (disminuyó la tasa fotosintética) que se pudo deber en forma probable, principalmente a la inhibición del ciclo de Calvin, como consecuencia del cierre de estomas, lo que causó una baja concentración interna de CO₂ por el cual limitan por un lado la fijación de CO₂ y la regeneración de Rubisco y por otro, la pérdida de transpiración para mantener los potenciales de agua dentro de los límites tolerables. Como lo ocurrido en plantas de tomate, Zgallaï *et al.* (2005), observaron que una disminución del potencial de agua de la hoja de -0.5 a -0.9 MPa,

redujo la fotosíntesis en un 58% y el cierre de estomas disminuyó la concentración interna de CO₂ en un 29%.

3.6.2 Cambios en la expresión de genes HSF

Dada la respuesta fisiológica que presentó la línea C7 y a resultados fisiológicos previos comparando el comportamiento del cv. Maradol y el genotipo Silvestre, era interesante comparar la respuesta a nivel molecular de los genes que desencadenan tolerancia a más de un tipo de estrés, como lo es la familia HSF. Para ello, se analizó el patrón de expresión génica diferencial de ocho genes: CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB1, CpHsfB2b, CpHsfB3 y CpHsfC1 en los 3 genotipos.

Tres de ellos, CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3, mostraron expresión en respuesta a déficit hídrico en los genotipos de *Carica papaya* comercial cv. Maradol y la línea C7 y en el genotipo silvestre. Los otros cuatro genes: CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfB1 y CpHsfC1, se expresaron de manera constitutiva. Mientras el gen CpHsfB2b no mostró respuesta a estrés por déficit hídrico entre los tres tipos de *Carica papaya* L.

Genes Hsf: Clase A

Los genomas de plantas contienen una gran cantidad de factores de transcripción (TF); por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* dedica aproximadamente el 5.9% de su genoma a codificar más de 1,500 TF (Wang *et al.*, 2003). En cuanto al género *Populus*, se ha encontrado que un 6.4% de su genoma codifica para más de 2,900 TF's (Riaño *et al.*, 2007), mientras que en el genoma de papaya transgénica *Carica papaya* L. cv. SunUp aproximadamente el 5.1% de su genoma codifica a 1,379 TF (1378 loci) que se clasifican en 58 familias. Entre estas familias destacan los factores de transcripción de choque térmico por activar mecanismos que previenen el daño causado por el estrés a calor. Durante la respuesta al choque térmico, las plantas acumulan proteínas de choque térmico que funcionan principalmente como chaperonas moleculares para facilitar el replegamiento de proteínas dañadas por el calor. Curiosamente, múltiples estudios se han enfocado en la familia de genes que codifican para factores de transcripción de choque térmico a estrés por altas temperaturas, sin embargo, una de las preguntas que nos planteamos es ¿los genes HSF también responden a déficit hídrico?, sucede que al menos tres genes (CpHsfA1d, CpHsfB3 y CpHsfC1) en *Carica papaya* L. se expresan

gradualmente a déficit hídrico. Rizhsky *et al.* (2002), encontraron en Tabaco que en diferentes condiciones de estrés como la sequía y las altas temperaturas pueden resultar en la activación de vías similares de respuesta al estrés, lo que sugiere que puede existir un alto grado de superposición entre grupos de genes activados por estos estreses. En este sentido, además del estrés por calor, HsfA1a también participa en la tolerancia de la planta a la sal, la sequía y el estrés oxidativo al inducir genes que codifican las proteínas HSP, esto se debe a que una secuencia HSE en la región promotora de la proteína de unión a elementos de respuesta a la deshidratación (DREB2A), funciona como un elemento de acción *cis* en la expresión génica inducible por estrés térmico. En *Arabidopsis*, DREB2A es uno de los factores de transcripción que activa la expresión gradualmente de genes sensibles a la sequía, mientras que, en calor, la expresión es inducida rápida y transitoriamente (Yoshida *et al.*, 2011). Inicialmente, el gen CpHsfA1a, fue seleccionado por su respuesta post estrés térmico en papaya cv. Maradol (Alcocer, 2013), además en *Arabidopsis* y tomate, HsfA1a regula la respuesta temprana y es reportado como regulador maestro responsable de la expresión génica inducida por estrés térmico. En este sentido, en respuesta a estrés hídrico existe solo un reporte en tomate en donde evalúan la expresión del gen SIHsfA1a durante 3, 6, 9 y 13 días de estrés hídrico, mostrando respuesta rápida con alto nivel de expresión a partir del día 6 sin riego, a los 9 y 13 días, el nivel de expresión disminuyó considerablemente (Wan *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestros resultados la expresión del gen CpHsfA1a en los tres tipos de *Carica papaya* (cv. Maradol, Silvestre y línea C7), fue constitutiva en respuesta a estrés por déficit hídrico. En *Solanum lycopersicum* el gen SIHsfA1a, es el principal regulador de la respuesta al calor, es decir es el gen más esencial para la termotolerancia que cualquier otro HSF, al suprimir SIHsfA1, la planta no puede sobrevivir un estrés por calor moderado (Mishra *et al.*, 2002). A diferencia del tomate, en *Arabidopsis thaliana* no se ha identificado el regulador maestro, otras proteínas Hsf pueden compensar a HsfA1a y HsfA1b, sin embargo, ambas son necesarias para el inicio temprano de la expresión de los genes HSF (Lopmann *et al.*, 2004).

De los genes analizados de la clase A: CpHsfA1a, CpHsfA1b y CpHsfA1d en *Carica papaya* L., uno respondió a estrés por déficit hídrico (CpHsfA1d) en los tres tipos de papaya. Hasta el momento no existen estudios que señalen el papel del gen HsfA1d en respuesta a estrés hídrico. Bechtold *et al.* (2013), reportaron que al sobreexpresar el gen

HsfA1b en *Arabidopsis thaliana* condujo positivamente en el crecimiento de las plantas, la tolerancia a la sequía y a la termotolerancia. Además, se reportó que los genes HsfA2, HsfA4a, HsfA6a y HsfB2a responden al estrés hídrico y salino, con mayor nivel de expresión del gen HsfB2a en hoja de *Arabidopsis thaliana* (Ghorbani *et al.*, 2019). Uno de los genes que respondieron al tratamiento de estrés hídrico en papaya de la clase A, fue el gen CpHsfA2; se conoce que participa como regulador clave en estrés individual por calor y sequía, pero también por estrés combinado (alta luminosidad y choque térmico) en *Arabidopsis thaliana* (Zhu *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2013; Charng *et al.*, 2007; Nishizawa *et al.*, 2006). Incluso en papaya cv. Maradol el gen CpHsfA2 presentó expresión similar en hoja, raíz, tallo y peciolo con nivel de expresión similar en el tiempo de estrés térmico (50 °C/1 h) y recuperación mientras que en tallo y raíz la expresión fue mayor durante el tiempo de estrés térmico (Alcocer, 2013).

Genes HSF Clase B

En cuanto el grupo HSF clase B, Dossa *et al.* (2016), analizaron la expresión de HSF bajo estrés por sequía en *Sesame indicum* L en dos accesiones: uno tolerante (LC164) y uno susceptible (hb168), mostrando diferencias de expresión en respuesta a déficit hídrico en diferentes tiempos de exposición a estrés, especialmente el gen SiHsfB3 presentó mayor expresión en el genotipo tolerante en respuesta a déficit hídrico. Nuestros resultados, concuerdan con dicho autor, en el sentido de que el gen CpHsfB3 participa bajo estrés hídrico en los tres genotipos de *Carica papaya* L, la expresión fue dependiente del estrés a mayor estrés hídrico mayor expresión y al aplicar el riego la intensidad de expresión fue menor, sin embargo, el análisis de expresión es cualitativa por lo que se propuso el método cuantitativo (RTq-PCR), en el capítulo IV de esta tesis. En los únicos reportes publicados de genes Hsf en *Carica papaya* L. son el de Tarora *et al.* (2010), en donde evalúan el gen CpHsfB1 en respuesta a estrés térmico, ellos observan que el gen CpHsfB1 se expresa con la misma intensidad en radícula en el tiempo control y a 42 °C de estrés, mientras que, en hoja, presenta baja expresión en el tiempo control y mayor expresión en el tiempo de estrés. Por otro lado, en papaya cv. Maradol, Alcocer (2013), sugirió que los daños fisiológicos no se daban de manera inmediata al término del evento estresante, por ello, evaluó como tiempos de estrés 4 h y 1 semana después del choque térmico (50 °C), donde encontró que el gen CpHsfB1 presentó un aumento en su expresión a las 4 h de

recuperación, pero una disminución a 1 semana de recuperación y que el CpHsfB2b presentó mayor expresión después de la semana de recuperación.

En respuesta a déficit hídrico, nosotros mostramos el primer reporte de expresión en tejido de hoja del gen CpHsfB3 en tres genotipos de *Carica papaya* L. en respuesta al grado de estrés hídrico aplicado. En *Carica papaya* L. posiblemente la presencia de mayor expresión del gen del grupo B nos lleva a pensar que probablemente funciona como coactivador cooperando con genes de la clase A durante el estrés por déficit hídrico. Caso similar a lo que ocurre en tomate con el gen LeHsfB1 (Bharti *et al.*, 2004). En *Sesamum indicum* donde el perfil de la expresión en el transcurso del tiempo de los genes Hsf en respuesta al estrés por sequía mostró que el 90% de los HSFs son sensibles a la sequía. Dossa *et al.* (2016), infieren que los miembros de la clase B-HSFs podrían ser los reguladores principales de la respuesta a la sequía, en sésamo, al cooperar con algunos genes HSF de la clase A. Mientras que en *Arabidopsis thaliana* se encontró que el gen AtHsfB1 actúa como represor, pero regula positivamente la termotolerancia adquirida (Ikeda *et al.*, 2011; Czarnecka *et al.*, 2004). Mientras que el gen CpHsfB2b no mostró respuesta a estrés por déficit hídrico entre los tres tipos de *Carica papaya* L., respecto a este gen se ha demostrado en arroz tolerante, que el gen OsHsfB2b se expresa fuertemente bajo estrés por calor, más que los otros miembros de la clase B y C, que por estrés salino e hídrico inducido con polietilenglicol y ABA. De igual forma, al sobreexpresar OsHsfB2b, las plantas fueron susceptibles a déficit hídrico (Xiang *et al.*, 2013). En el caso de papaya cv. Maradol, la expresión del gen CpHsfB2b en respuesta a estrés por alta temperatura la respuesta del gen fue tardía, es decir, se presentó mayor expresión después de las 4 h de recuperación (Alcocer, 2013). Lo anterior nos indica que el gen CpHsfB2b esta más involucrado en la termotolerancia que en la respuesta a déficit hídrico.

Genes HSF: Clase C

En particular, el papel de la subclase C es actualmente desconocido en plantas dicotiledóneas, sin embargo, se han encontrado diversos HSFs de la clase C en muchas especies monocotiledóneas, como por ejemplo en trigo se han identificado 10 miembros de la clase C (TaHsfC1c, TaHsfC1d, TaHsfC1e, TaHsfC2a, TaHsfC2b, TaHsfC2c, TaHsfC2d, TaHsfC2e, TaHsfC2f, TaHsfC2g). Un análisis transcriptómico mostró que los

genes HsfC se expresan por estrés térmico en varias especies de plantas, aunque también en algunas especies respondieron al estrés osmótico, estrés por frío o ABA, como lo reportado por Hu *et al.* (2018), en trigo, el gen TaHsfC2a-b activó genes de protección térmica y actuó a través de la vía reguladora mediada por ABA para conferir protección térmica. Otro dato interesante publicado por Hu (2009), en arroz, mostró que el gen OsHsfC2a se expresó diferencialmente en los diferentes tiempos de estrés (1, 3, 10 horas) en respuesta a estrés por calor, sequía y sal, mientras que OsHsfC1b respondió al frío, la sequía y sal. En *Triticum aestivum*, Xue *et al.* (2013), encontraron en el grupo C expresión constitutiva en un nivel alto en la mayoría de los órganos (hoja joven, hoja adulta, raíz, tallo, endospermo y embrión). En hojas jóvenes, los niveles de expresión de HSF del grupo C1 fueron incluso más altos que los del grupo A1. Los miembros del grupo C2 se expresaron predominantemente en los embriones y las raíces, y también fueron generalmente regulados por el estrés por calor, excepto TaHsfC2a y TaHsfC2b que fueron regulados por incremento en las hojas por un tratamiento térmico a corto plazo. En las especies mencionadas, miembros del grupo C de la familia HSF, se expresaron diferencialmente en diferentes estreses. Entre otra especie de plantas dicotiledónea como *Glycine max* (Li *et al.*, 2014), con dos la subclase C1 y C2 fue expresado bajo el estímulo de estrés hídrico y estrés por calor. Sin embargo, en algunas especies dicotiledóneas se ha informado un HSF en la clase C (HsfC1) y su caracterización de la función es reciente Gengxian (2017), que HsfC1 juega un papel en el desarrollo de *Arabidopsis* y la respuesta de señalización ABA. En papaya cv. Maradol se estudió el gen CpHsfC1 en respuesta a estrés térmico y se observó que el aumento de expresión surgió en la etapa de recuperación que consistió en colocar las plantas durante 7 días en condiciones controladas 25 °C (Alcocer, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que la expresión del gen CpHsfC1 en los tres tipos de *Carica papaya* L. (Maradol, línea C7 y Silvestre), fue constitutiva en el tejido de hoja joven, en respuesta a sequía. Lo que indica que el gen CpHsfC1, si esta presente en *C. papaya* L., pero al parecer en este tipo y tiempo de estrés hídrico, no se observó expresión diferencial.

3.7 CONCLUSIONES

- Las plantas de *Carica papaya* L. tipo C7, son capaces de recuperar su potencial hídrico casi totalmente al reincorporar el riego. Durante la pérdida de potencial hídrico la eficiencia cuántica del PSII no se vio afectada, pero si su tasa fotosintética. A los 7 días de estrés causó una disminución importante en la conductancia estomática con lo cual el posible cierre de estomas puede limitar la entrada de CO₂, esto también por una menor transpiración, limitó la pérdida de agua, para que la planta pudiera mantener un potencial hídrico y turgencia que pudiera mantener la funcionalidad de la planta.
- En el caso de la transpiración, la línea C7 presentó una disminución escalonada en la transpiración en los diferentes tiempos de estrés, a mayor tiempo de estrés la transpiración fue mayor hasta alcanzar los 21 días de estrés, donde se observó el valor menor de transpiración, posiblemente para evitar la pérdida de agua. Mientras que, al reincorporar el riego, la transpiración de la línea C7 fue capaz de llegar a valores muy cercanos al control. Nuestros datos indican que esta línea C7, es capaz de responder en forma equiparable al estrés por déficit hídrico, pero manteniendo una alta capacidad de recuperarse al mejorar su estatus hídrico.
- La fluorescencia de clorofila, indican que la línea C7 es capaz de proteger su fotosistema II, sin daños irreparables ya que, los valores de Fv/Fm, no fueron fuertemente disminuidos, aún a los diferentes tiempos de estrés (de los 7 a los 21 días). Y al reincorporar el riego, su eficiencia de Fv/Fm, se restablece. Lo anterior sugiere cierta tolerancia a estrés por déficit hídrico en este genotipo o que este parámetro no se ve afectado y se requiere de otro(s) parámetro(s), como las curvas OJIP, que se analiza en el siguiente capítulo.
- El patrón de expresión de los genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfB1, y CpHsfC1, fue de manera constitutiva en los genotipos Maradol, Silvestre y línea C7 de *Carica papaya* L., lo que sugiere que estos genes están presentes en la especie pero que no parecen estar involucrados en los mecanismos de respuesta a un estrés por déficit hídrico.
- Por el contrario, se observa una diferencia en los patrones de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3: en condiciones control, la intensidad de banda es baja en los tres genes, mientras que durante los tiempos de estrés (7 y 14 ó 21 días

de exposición), la expresión de estos genes aumenta, mismas que disminuyen una vez iniciado los dos tratamientos de recuperación (15, 21 y 22, 28 d), en el cv. Maradol y línea C7. Diferente a los perfiles de expresión de estos genes HSF en la línea C7 y el genotipo Maradol, el genotipo Silvestre mostró intensidad de banda durante los tiempos de estrés y recuperación. Lo que sugiere la diferencia de reparación de estrés y posible mecanismo de tolerancia del genotipo Silvestre de *Carica papaya* L. bajo estrés hídrico

- En particular, la expresión del gen CpHsfB3 es fuertemente inducida por el estrés por déficit hídrico, se observa una inducción del día 7 al día 14, en los tipos Maradol y Silvestre; y así la expresión se induce a los 14 y 21 días, en el tipo C7. Este mismo comportamiento fue para el gen CpHsfA1d en los tres genotipos de papaya en donde se induce su expresión en respuesta a los días de estrés hídrico. Lo que sugiere que este gen (CpHsfB3) podría ser el principal regulador en respuesta a déficit hídrico de *Carica papaya* L. Mientras el gen CpHsfA2 del genotipo Silvestre se expreso a los 14 días de estrés hídrico, es decir tuvo una respuesta tardía.

CAPÍTULO IV CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO, TÉRMICO Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS, SOBRE LA FISIOLOGÍA DE DOS GENOTIPOS DE *Carica papaya* L. Y LA EXPRESIÓN DE GENES HSF

4.1 INTRODUCCIÓN

En campo, las plantas están expuestas frecuentemente a una combinación de estrés abiótico como sequía y calor. Muchos estudios se han centrado en el análisis de estrés individual; sin embargo, poco se sabe de la respuesta fisiológica y molecular de una combinación de estrés.

El estrés causado por déficit hídrico y temperaturas altas, se consideran los dos factores abióticos principales que limitan el crecimiento y el desarrollo de las plantas, lo que en consecuencia provoca grandes pérdidas en la producción agrícola en todo el mundo. La fuerte relación del agua de la planta y la temperatura hace que sea difícil separar ambos factores abióticos, sin embargo, pueden tener efectos fisiológicos y moleculares muy diferentes. En respuesta al estrés por calor los procesos involucrados en la fotosíntesis son más tolerantes en comparación a déficit hídrico, en contraste el fotosistema II es más sensible a temperaturas altas. La respiración incrementa exponencialmente al aumentar las temperaturas, por otro lado, el déficit hídrico puede provocar una disminución de la respiración de las hojas (Prasad *et al.*, 2008). En cambio, las plantas sometidas a una combinación de sequía y estrés por calor revelan efectos perjudiciales significativamente mayor, como la respiración alta con baja fotosíntesis, estomas cerrados y temperatura de la hoja alta (Mittler, 2006).

Por lo tanto, para adaptarse al estrés abiótico, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación a nivel molecular, para modular la homeostasis celular mediante la activación transcripcional de genes sensibles al estrés (Tolosa y Zhang, 2020). En este caso, se conoce que los genes HSF desempeñan un papel central en la respuesta al estrés por calor, aunque algunas investigaciones han mostrado que los HSF también se expresan en respuesta a estrés hídrico y salino (Kotak *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2007). En *Solanum lycopersicum* el gen HsfA1 ha demostrado una función única como el regulador maestro para la termotolerancia adquirida (Mishra *et al.*, 2002). En *Triticum aestivum*, los niveles de transcripción de los miembros TaHsfA2 y TaHsfA6 se convirtieron en los genes dominantes

en respuesta a estrés por calor, los genes TaHsfA2, TaHsfA3, TaHsfA6, TaHsfC1 y TaHsfC2 mostraron mayor expresión durante el estrés por sequía en hoja (Xue *et al.*, 2014). En *Carica papaya* L. existe un solo reporte del cultivar taiwanés de expresión constitutiva del gen CpHsfB1 en radícula y la expresión inducible en hoja joven a estrés por calor (42 °C) durante 30 min (Tarora *et al.*, 2010). Por otro lado, en *Carica papaya* L. cv. Maradol en respuesta a estrés por temperatura alta, se encontró intensidad alta de banda del gen CpHsfA2 y CpHsfB1 durante la etapa de estrés, mientras que los genes CpHsfA1a, CpHsfB2b y CpHsfC1 su expresión surgió en la etapa post estrés del estrés térmico (Alcocer, 2013).

En este sentido, *Carica papaya* L. es un importante cultivo, debido a su diversidad de usos; su cosecha anualmente a nivel mundial es de 13,290.320 de toneladas; hoy en día es la tercera fruta tropical más consumida en el mundo (FAOSTAT, 2018). En general, la temperatura óptima para su crecimiento está entre 21 y 33 °C, con un óptimo para la fotosíntesis entre 25 y 30 °C, además se requiere condiciones óptimas de riego para tener un continuo y adecuado amarre de frutos. Las poblaciones nativas de papayas silvestres se distribuyen en regiones áridas y semiáridas de la península de Yucatán (Fuentes y Santamaria, 2014). Estos poseen una característica distintiva, el fruto que produce es muy pequeño, con numerosas semillas y muy poca pulpa, y pueden llegar a medir 4 o 5 cm. Además, son muy importantes, ya que representan un recurso genético importante del paisaje natural de la localidad y siendo usada por las comunidades étnicas mayas, que puede facilitar el desarrollo de cultivares tolerantes a cambios climáticos, como sequía y temperaturas altas que son ambientes propios de esta región (Chávez, 2018).

En nuestro grupo de trabajo, se han realizado varios estudios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, en dos genotipos: Silvestres y cv. Maradol, en el cual varios autores han mostrado que las plantas silvestres son más tolerantes a la sequía y a temperaturas altas que los cultivados de forma comercial, tipo Maradol (Estrella *et al.*, 2019, Romero, 2018; Girón, 2015; Alcocer, 2013). Actualmente, analizamos el efecto de estrés individual y combinado a nivel fisiológico y de expresión de genes como los genes: CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 candidatos previos por un lado en el capítulo II de esta misma tesis y de un análisis transcriptómico en respuesta a déficit hídrico (Estrella *et al.*, 2019) esto para comprender los mecanismos de respuesta y el rol de los genes HSF asociados con la

adaptación al estrés por sequía y temperaturas altas. De esta manera, nuestros resultados dan pauta hacia la mejora de la tolerancia a temperaturas altas y a la sequía en *Carica papaya* L.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

El material vegetal del genotipo silvestre se obtuvo a partir de frutos colectados en diferentes localidades del Estado de Yucatán, en el Km 59, 60, 70, 71, 72 y 74 (N 89° 10'11" y WD 20°49' 13.8"; N 20° 48'48.6" y WD 89°05' 57.2"; N 20°47'59" y WD 88°59'57.2"; N 20°47'57.4" y WD 88°59'49.6"; N 20°47'55.6" y WD 88°59'41.9" y N 20°47'52.4" y WD 88°59'39.2", respectivamente) de la carretera federal Kantunil, Cancún y la desviación de la carretera Cancún-Izamal y Xanaba-Sudzal. En cuanto las semillas del genotipo Maradol se obtuvieron de la casa comercial semillas del Caribe®. Los frutos del genotipo silvestre fueron trasladados al Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular del Centro de Investigación Científico de Yucatán, (CICY), para su maduración y posterior obtención de las semillas.

4.2.2 Germinación de las semillas de *Carica papaya* L.

Se seleccionaron 100 semillas de los frutos silvestres del km 70 y del genotipo cv. Maradol de las cuales se les dio un tratamiento pre-germinativo, para ello se utilizó el protocolo reportado por Muñozcano y Martínez (2008), modificado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular. Después de que la radícula midiera más de 0.5 mm, las semillas germinadas se pasaron a charolas de crecimiento que consistió en colocar cada semilla germinada a 1 cm de profundidad en charolas de plástico (35 cavidades) utilizando como sustrato Peat moss (Sunshine). El riego en la etapa de germinación consistió en 10 mL de agua a diario, después, el riego fue con 20 mL de agua cada dos días hasta cumplir los primeros 25 días (d).

4.2.3 Aclimatación de plantas de *Carica papaya* L.

A los 25 días de edad fisiológica, las plántulas fueron trasplantadas a bolsas negras de tipo injerto, con un sustrato 1:1/5 de Peat moss (Sunshine) y agrolita. Se mantuvo el riego constante cada segundo día de 40 mL. La temperatura promedio de aclimatación fue 25 ± 2 °C y una densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas fueron fertilizadas dos veces por semana con Radix 1500 y Miracle-Gro y con micronutrientes una vez por semana.

4.2.4 Caracterización de estrés térmico, hídrico y combinado en genotipos Maradol y silvestre

Se utilizaron plantas de 98 días de edad de genotipos Maradol y silvestre previamente aclimatadas a 25 ± 2 °C. Con la finalidad de evaluar la respuesta de estrés máximo en plantas de *Carica papaya* L., con base a los antecedentes previamente mencionados, se evaluaron tres tratamientos en respuesta a estrés abiótico: sequía (SQ), choque térmico (50 °C/2 h), y un estrés similar a lo que ocurre en campo; la dualidad de estrés por sequía más choque térmico (SQ+50 °C/2 h).

Los tratamientos control (CT) consistieron en mantener las plantas bien regadas con un potencial hídrico del suelo cercano a -0.05 MPa y a una temperatura de 25 ± 2 °C, el tratamiento por déficit hídrico (SQ) consistió en mantener el grupo de plantas sin riego durante 14 días en 25 ± 2 °C, mientras que el grupo de plantas del tratamiento por choque térmico (50 °C/2 h) se mantuvieron en una cámara térmica con una temperatura constante 50 °C durante dos horas. En el caso del estrés combinado: sequía más choque térmico, se destinó un grupo más de plantas, lo cual consistió en mantener las plantas durante 14 días sin riego y posteriormente someterlas a choque térmico a 50 ± 2 °C durante dos horas. En cuanto a la recuperación, al terminar cada uno de los tratamientos de estrés por: déficit hídrico, estrés térmico y estrés combinado, las plantas fueron reincorporadas a riego y en temperatura control de 25 ± 2 °C, para evaluar su estado de recuperación por 168 h (7 días).

En cada uno de los tratamientos, se midieron parámetros fisiológicos como; potencial hídrico (Ψ_H), contenido relativo de agua (CRA, %), fluorescencia de clorofila (Fv/Fm), Rendimiento máximo PI_{abs} , fuga de electrolitos (FE, %), fotosíntesis (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), conductancia estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) y transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para caracterizar el estado de estrés de las plantas.

4.3 Análisis fisiológicos

4.3.1 Potencial hídrico (MPa)

Para determinar el potencial hídrico (Ψ_H), se seleccionaron 3 muestras de tejido de la hoja más joven completamente expandidas de cada planta. A estas hojas se les tomó una muestra con un sacabocado de 4 cm de diámetro en la parte suave de la hoja (evitando la nervadura central). Los discos de hoja se colocaron en una cámara húmeda a una temperatura de 24 ± 2 °C durante dos horas para aclimatarse, concluido este tiempo, se tomó la lectura en la cámara sellada del equipo WP4C Dewpoint potentiaMeter© (Decagon Devices, Inc).

4.3.2 Contenido Relativo de agua (CRA)

El contenido relativo de agua (%) se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula $CRA = (PF - PS) / (PT - PS) * 100$. 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 utilizaron 3 cortes de 1.5 cm² por planta de la parte suave de una misma hoja; cada corte se pesó (PF), luego se suspendieron en agua (sin sumergir) y se dejó reposar a luz tenue y una temperatura de 25 °C por 24 h. Se pesó de nuevo (PT) retirando el exceso de agua; posteriormente se secó en una estufa de secado (VWR, United States of America) a 80 °C durante 24 h y se pesó de nuevo (PS). Esta determinación se realizó de acuerdo con el protocolo del Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular.

4.3.3 Eficacia del aparato fotosintético: Fluorescencia de clorofila (Fv/Fm)

Para analizar el índice de rendimiento (PI_{abs}) y el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II en *Carica papaya* L., se determinó el cociente de fluorescencia variable (Fv) sobre fluorescencia máxima (Fm), Fv/Fm; que se ha definido como una medida no destructiva y nos indica la eficiencia fotoquímica y como un criterio de respuesta y cuantificación del daño o alteración del mismo, indicando el nivel de estrés al que se encuentra expuesta una planta (Jiménez *et al*, 2015; Critchley and Smillie, 1981). Estas mediciones se realizaron utilizando un fluorómetro de clorofila (FMS 2 Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). La técnica consiste en colocar un clip especial sobre la superficie de la hoja de cada planta y adaptar esta superficie a la obscuridad durante 30 min suficiente para la oxidación completa de los centros de reacción. Transcurrido este tiempo se expusieron a un pulso de luz roja saturante (650 nm, 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante

2 segundos. Los parámetros biofísicos establecidos por la prueba OJIP se calcularon con base a todos los transitorios de fluorescencia en escala de tiempo logarítmica que se basa en cómo el flujo de fotones absorbido por los pigmentos de antena fotosintéticos (ABS^0) se disipan como calor (DI^0) y fluorescencia, o se conduce como flujo de retención (TR^0) a los centros de reacción que se convierten en energía redox reduciendo la plastoquinona (QA a QA-). QA- posteriormente se reoxida a QA y crea el transporte de electrones (ET) que conduce al equilibrio en la captura y asimilación de dióxido de carbono (CO_2) (González *et al.*, 2007; Strasser *et al.*, 2000).

4.3.4 Fotosíntesis (Pn)

La tasa fotosintética de las hojas de *Carica papaya* L., se determinó utilizando un sistema portátil de análisis de gases en el espectro infrarojo (IRGA, por sus siglas en inglés), LICOR LI 6400, Lincoln, Nebraska, USA) con cámara para hoja de 6.00 cm² con una relación de estomas entre la parte adaxial/abaxial de 0.1. Las mediciones se llevaron a cabo bajo un flujo constante de aire de 350 $\mu\text{mol s}^{-1}$ de CO_2 y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para las mediciones se colocó la hoja en la cámara y utilizando el programa pre-cargado en el equipo, se esperaron 8 segundos para estabilizar la medición inicial y obtener las lecturas de: fotosíntesis (Pn, $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductancia estomática (g_s , $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$) y transpiración (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.3.5 Fuga de electrolitos

El incremento en la pérdida de solutos puede ser utilizado como un indicador de la estabilidad de las membranas y como una medida indirecta de tolerancia de las plantas a los estreses aplicados (Chaves y Gutiérrez, 2017). Para conocer la fuga de iones (%), se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: Fuga de electrolitos= $(C_1/C_2) * 100$. Se utilizó un sacabocado de 4 cm de diámetro para realizar cortes en forma circular, evitando nervadura de la hoja; por cada planta se sacaron 3 discos de una misma hoja, los cuales se colocaron en 15 mL de agua destilada. Se incubaron y agitaron por 3 h, y se midió la conductividad eléctrica inicial (C1); posteriormente, estos discos se colocaron en autoclave durante 40 min para lograr daño celular, una vez que la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se midió la conductividad eléctrica final (C2). Se utilizaron los protocolos de

Clarke *et al.* (2004), Lu *et al.* (2003) y Bajji *et al.* (2002), modificados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular.

4.3.6 Aislamiento de RNA

El RNA del tejido hoja se aisló con el protocolo de TRIZOL® (Invitrogen®) adicionando un paso de purificación siguiendo el protocolo DNAasa I (TURBO DNA-free™, Invitrogen) estandarizado en nuestro laboratorio. La concentración y pureza de RNA se determinaron con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000C (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), y la integridad del RNA se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las condiciones de corrida fueron 90 V, 30 min y 400 mA, para confirmar la integridad del RNA extraído. Las extracciones se realizaron con tres repeticiones por tiempo de estrés y fue almacenado a -80 °C.

4.3.7 Curva estándar para determinar la eficiencia del PCR en tiempo real

El análisis de la eficiencia de reacción de cada par de primers (forward y reverse) sintetizados para cada gen seleccionado (CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB3 y CpEF1α) se validó utilizando el procedimiento de la curva estándar. Las diluciones seriadas (1:5) se realizaron a partir de volúmenes de 15 µL. Cada reacción de PCR de 20 µL contenía: 0.5 µL de oligonucleótido sentido, 0.5 µL de oligonucleótido anti sentido (10 Mm), 3 µL de DNA complementario (300 ng) de las diluciones seriadas y 16 µL SYBR Green diluido con H₂O libre de DNAasa. El protocolo de ciclado se diseñó teniendo una primera etapa de desnaturalización durante 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, una etapa de alineamiento a 59 °C durante 1 minuto, 95 °C durante 15 segundos, 59 °C 1 minuto y 95 °C durante 15 segundos. Se usaron 3 repeticiones por punto de la curva estándar para minimizar la variación estándar entre repeticiones.

4.3.8 Diseño de experimento para RTq-PCR

La transcripción reversa-PCR tiempo real (RTq-PCR), se realizó por triplicado y se usó el gen CpEF1α de *Carica papaya* L. como referencia para la normalización. Las reacciones de RTq-PCR se realizaron en la plataforma StepOne Plus 7500, de la siguiente manera: desnaturalización, 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos con desnaturalización a 95 °C (15 s), y alineación a 60 °C durante 1 minuto para los tres genes evaluados CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfB3. Para las reacciones de RT-qPCR, se utilizaron los siguientes

elementos por reacción: 0.5 μ L de oligonucleótido sentido, 0.5 μ L de oligonucleótido anti sentido (10 Mm), 3 μ L de DNA complementario, usando como reactivo de amplificación al Power SYBR® Green 16 μ L diluido con H₂O.

4.3.9 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones para determinar la variación entre las variables evaluadas de los dos genotipos de *Carica papaya* L. Los datos se procesaron por Análisis de Varianza (ANOVA) y se hicieron comparaciones múltiples de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). Para comparar los grupos de estrés y post estrés se utilizó la prueba de Kruskal Wallis con el programa estadístico IBM SPSS Statistics V21.0 (IBM Corporation, Armonk, New York).

Los resultados se presentaron como medias \pm DE (desviación estándar) mediante gráficas elaboradas con el programa Sigma Plot v11.0 que incluyen la DE. Además, se aplicaron análisis de regresión lineal simples y el coeficiente de Pearson, para explorar la correlación entre las las variables: fotosíntesis, %fuga de electrolitos, PI_{abs} y nivel de expresión relativa de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Caracterización de la exposición de estrés hídrico y térmico, sobre la morfología de dos genotipos de *Carica papaya* L.

En la secuencia fotográfica que indica la figura 4.1, mostramos los cambios morfológicos observados en plantas de papaya en respuesta a déficit hídrico (sin riego durante 14 días) observamos: pérdida de clorofila, reducción de turgencia, disminución de crecimiento, abscisión de hojas y adelgazamiento de tallo (Figura 4.1.2). Respecto al tratamiento de choque térmico (50 °C durante dos horas), observamos dos daños; pérdida de turgencia y enrollamiento de las hojas, el efecto fue menos notorio en el genotipo Silvestre (Figura 4.1.1) En cambio, en el tratamiento combinado por déficit hídrico y choque térmico (14 días sin riego más 50 °C durante dos horas), los cambios morfológicos fueron mayores; disminución de clorofila, enrollamiento de hoja, pérdida de turgencia, disminución de crecimiento, abscisión foliar, adelgazamiento del tallo en ambos genotipos Maradol (M) y Silvestre (S) (Figura 4.1.3). Llamo la atención el efecto de la coloración de las hojas en especial en el tratamiento de déficit hídrico de pasar de color verde intenso, a un verde claro (clorosis) y a un ligero color negro en los bordes de las hojas viejas más frecuente en el genotipo Silvestre que en Maradol (Figura 4.2). Respecto a los tiempos de recuperación (post estrés) que consistió en: 1) reincorporar el riego de las plantas (después de 14 días sin riego y luego de aplicado el riego durante 7 días con 90 mL de agua), 2) que después del tratamiento de choque térmico (por 2 horas a 50°C) las plantas se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2 °C de igual manera los grupos de plantas en el tratamiento combinado de sequía (por 14 días) y estrés térmico (por dos horas), las plantas se re-hidrataron con 90 mL de agua cada segundo día durante 7 días (168 h) y regresaran a una temperatura de 25 ± 2 °C. A los 7 días de recuperación, se observó recuperación de pigmentos de la clorofila en las hojas jóvenes, crecimiento de nuevos brotes, crecimiento de la planta y hojas turgentes en todos los tratamientos en ambos genotipos. Estas fueron observaciones interesantes y posteriormente se presentan y analizan los resultados de los parámetros fisiológicos propuestos.

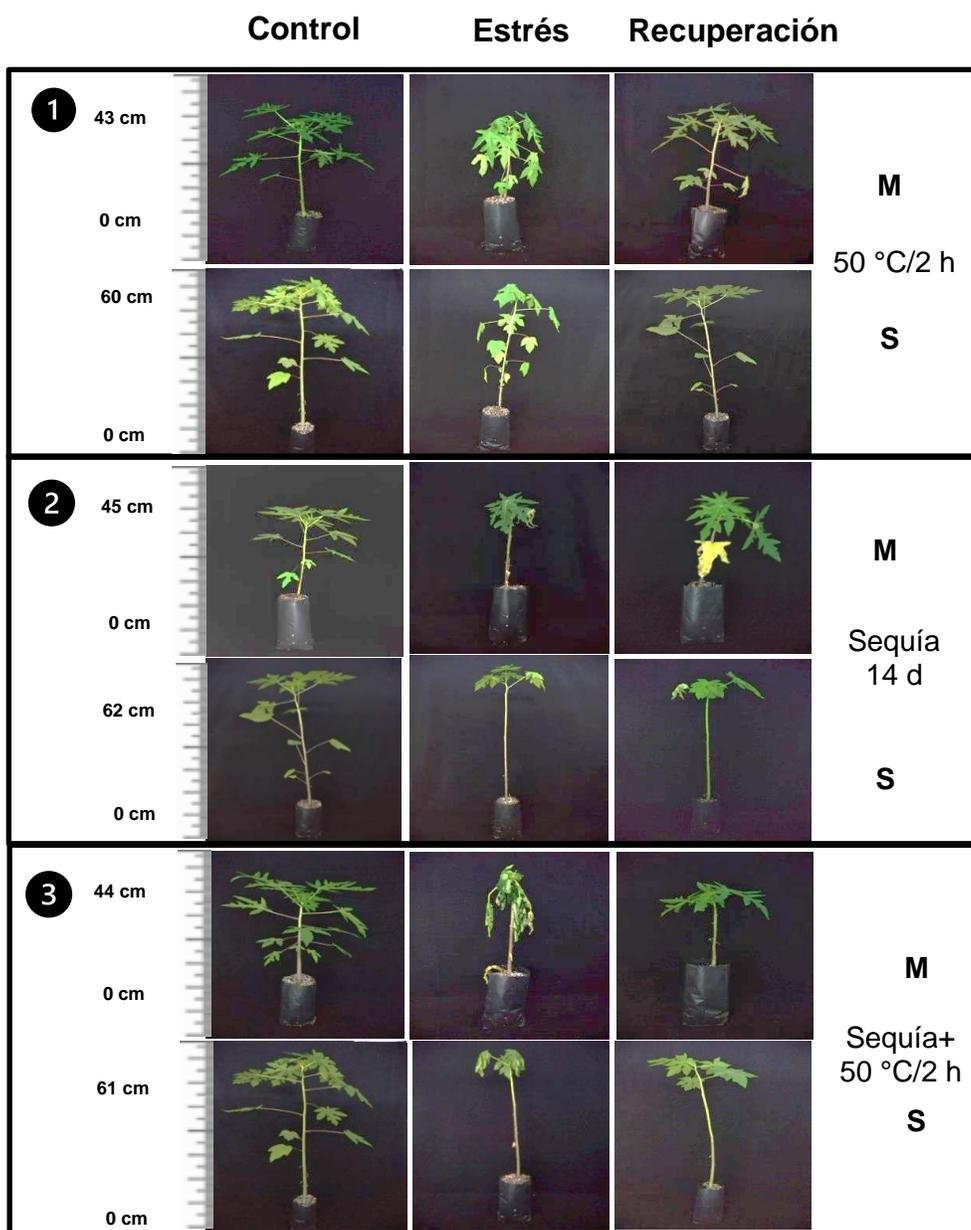


Figura 4.1 Efecto en *C. papaya* L. del estrés en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol (M) y silvestre (S). Control: Plantas en condiciones control de riego y temperatura. Estrés: 1) Plantas expuestas a estrés por choque térmico (50 °C durante dos horas). 2) Plantas expuestas a sequía (suspensión de riego durante 14 días en 25 °C). 3) Plantas expuestas a dualidad de tratamiento de sequía más choque térmico (suspensión de riego durante 14 días más 50 °C durante dos horas). Recuperación: Los tratamientos de recuperación que consistieron en reincorporar las plantas a su estado control de riego y temperatura (25 °C) durante 168 h.



Figura 4.2 Efecto de estrés por déficit hídrico y número de hojas de una planta de *Carica papaya* L. cv. Maradol y silvestre. Del lado izquierdo indica los tratamientos: control (CT), Sequía (SQ), recuperación (Rp) y del lado derecho la letra M corresponde al genotipo Maradol y con la letra S el genotipo silvestre.

4.4.2 Estado hídrico de la planta en respuesta a la exposición de estrés abiótico en dos genotipos de *Carica papaya* L.

El estado hídrico, medido como potencial de agua en la planta, comenzó con valores promedio constantes, sin diferencias significativas, en tiempo 0 (o condición control) se observaron valores de -0.79 MPa en el genotipo Maradol (barra verde) y de -0.76 MPa el genotipo Silvestre (barra naranja) (Figura 4.3). Valores <-1.0 MPa indican plantas con un riego adecuado, confirmado con los resultados elevados obtenidos del Contenido Relativo de Agua (CRA) de las plantas control, con valores de 95% de CRA en los tres tratamientos control (Figura 4.3A, D).

Respecto a nuestro primer tratamiento de estrés por choque térmico (50 °C durante dos horas) el genotipo Maradol, mantuvo el potencial hídrico de la planta con valores de -0.79 MPa, en cambio el potencial hídrico del genotipo Silvestre fue más negativo con valores de -1.51 MPa, valor registrado en la literatura como punto de marchitamiento permanente. Al contrario, el CRA en el cv. Maradol mantuvo un valor de 85%, valor más bajo que en condiciones control, pero similar al del genotipo silvestre (86%). Después de incorporar el tratamiento a condiciones de recuperación durante 7 días (168 h), se esperaba que el potencial hídrico de las hojas del cv. Maradol fuera menor al valor reflejado con el tratamiento de estrés (-0.78 MPa), sin embargo, el valor de potencial de agua fue de -0.85 MPa en el genotipo Maradol; por otro lado, en el genotipo silvestre el valor de potencial hídrico incrementó de -1.5 MPa (tratamiento de estrés) a -1.0 MPa en recuperación, sin diferencias significativas entre genotipos. Es decir, los 7 días fueron suficientes para recuperar el potencial hídrico con valores menos negativos en los dos genotipos. En efecto, los resultados del CRA mostraron la capacidad de recuperación al presentar valores del 94% de CRA valor muy cercano al tiempo control (95%), para ambos genotipos después de un choque térmico.

En nuestro segundo tratamiento de estrés por déficit hídrico (14 días sin riego) encontramos un patrón similar al anterior estrés por choque térmico; el potencial hídrico disminuyó en mayor medida en el genotipo Silvestre a -2.6 MPa que el genotipo Maradol con valores de -1.7 MPa. En efecto, el CRA en Maradol fue ligeramente mayor con valores de 84% que en el genotipo silvestre que presentó valores del 83%. Al reincorporar el riego a las plantas estresadas después de 7 días, observamos que el tratamiento Maradol

alcanzó un potencial de -0.48 MPa, incrementó su potencial de agua respecto al control; mientras el genotipo Silvestre recuperó el 50% del valor (-1.37 MPa) de potencial hídrico perdido durante el estrés. No obstante, el CRA aumentó significativamente a valores control, 95% de CRA para el cv. Maradol y para Silvestre del 94% (Figura 4.3B, E). Lo cual resulta muy interesante, que tanto el estrés por temperatura y por déficit hídrico afectó más el potencial hídrico de la planta, que el CRA, ya que no hay tanto cambio en este parámetro, solo se ve afectado por el estrés combinado que, si se observa una disminución mayor de CRA y una afectación mayor en el potencial hídrico, pero se recupera en siete días. Pareciera que el contenido relativo de agua se distribuye de tal forma en la planta que al estar en condiciones de recuperación la redistribución de agua se hace más rápido.

Respecto al tercer tratamiento de estrés por déficit hídrico más choque térmico (14 días sin riego + 50 °C durante 2 horas), el potencial hídrico fue el que más disminuyó en el genotipo Maradol con un valor promedio de -2.9 MPa, en el caso de genotipo Silvestre fue ligeramente mayor con un valor de -2.6 MPa, sin diferencias significativas entre genotipos, documentando así, que este tratamiento fue el que afectó más el potencial hídrico de las plantas, lo cual se relaciona con las observaciones morfológicas (Figura 4.1). Con relación al Contenido Relativo de Agua, disminuyó a valores de 55% en el genotipo Maradol (el valor más bajo observado), mientras que el genotipo Silvestre bajo a valores de 67% de CRA en las hojas. Del mismo modo, después de la reincorporación del riego y a una temperatura de 25 °C, Maradol fue capaz de recuperar su potencial hídrico a -0.84 MPa mientras que el genotipo silvestre presentó valores de -1.0 MPa después de las 168 h de integrar el riego. Sin embargo, los datos del CRA demuestran lo contrario, en el genotipo Maradol presentó un contenido de agua del 92% y el genotipo silvestre de 93% (Figura 4.3C, F). Finalmente, el potencial hídrico fue menor en los tratamientos de estrés hídrico (14 días sin riego) y la combinación de estrés térmico más hídrico (14 días sin riego más 50 °C durante 2 horas), dado dichos valores, la fotosíntesis y otros procesos fisiológicos que se mencionan a continuación serán más sensibles que al estrés térmico, como lo indica Jones y Rawson (1979), en sorgo con potenciales foliares de -1.5 a -3.0 MPa, bajo estrés hídrico.

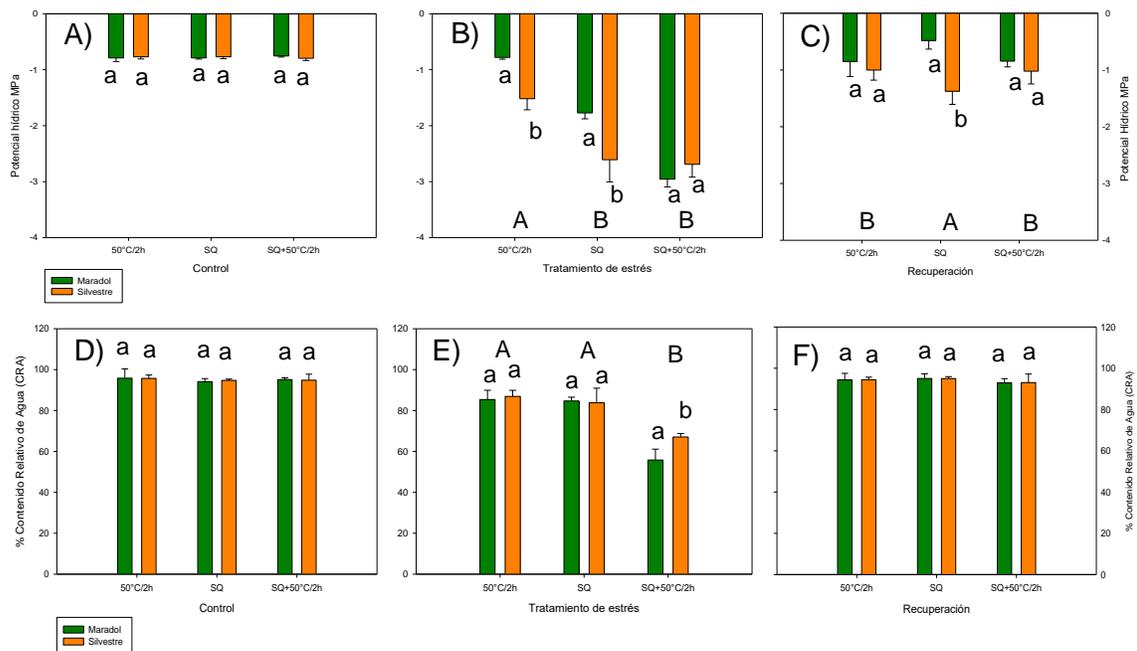


Figura 4.3 Potencial hídrico y Contenido Relativo de Agua (CRA), de dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h), sequía (SQ) y choque térmico más sequía (50 °C/2 h+SQ). A, D) Plantas control, B, E) Plantas con tratamientos de estrés y C, F) Plantas reincorporadas a condiciones de riego y temperatura control, durante 168 h. Las barras representan la desviación estándar de cinco réplicas. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre genotipos y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.3 Estado fotoquímico del fotosistema II y su índice de rendimiento PI_{abs} en plantas de *Carica papaya* L. en respuesta a estrés abiótico

La eficiencia cuántica máxima del parámetro de fotoquímica PS II (F_v/F_m) es uno de los valores más usados que indica estrés en las plantas incluso antes de que aparezcan los síntomas visibles en las hojas, este valor aporta información sobre la proporción de la luz absorbida por la clorofila en el PSII que se utiliza en procesos fotoquímicos extremos, es decir, fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m) (Lepedus *et al.*, 2012). A diferencia, el índice de rendimiento (PI_{abs}) es un parámetro que considera la concentración de centros de reacción por clorofila, el transporte de electrones y la disipación del exceso de energía de excitación, logrando el rendimiento de la fotoquímica del fotosistema II bajo condiciones de estrés bióticos y abióticos (Živčák *et al.*, 2008). Por lo tanto, PI_{abs} es un parámetro sensible a los cambios en las propiedades de la antena, la eficiencia de captura o el transporte de electrones más allá de la plastoquinona primaria (Q_A).

De esa manera, el tratamiento control mantuvo valores de F_v/F_m de 0.83 que reflejan la funcionalidad del fotosistema II en ambos genotipos. Y un índice inicial de PI_{abs} de 8 y 7, entre los genotipos Maradol y Silvestre, respectivamente (Figura 4.4A, D). Datos cercanos de F_v/F_m a 0.8 documentado en la literatura, es indicativo de integridad y uso eficiente de la energía de excitación en el proceso fotoquímico del fotosistema II, valores inferiores sugieren que las plantas están creciendo bajo estrés y que los centros de reacción de PSII están dañados, lo que, a su vez, está relacionado con una eficacia reducida del transporte de electrones (Kalaji *et al.*, 2012). Respecto al índice de rendimiento en un experimento realizado por Vincent *et al.* (2015), en plantas de *Carica papaya* cv “Red Lady” de tres meses de edad, valores de 5.6 de PI_{abs} fueron los obtenidos de sus tratamientos control.

Las plantas que se encontraban en tratamiento de estrés por choque térmico (50 °C durante dos horas), presentaron poca sensibilidad en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, sin embargo, entre genotipos, se observaron diferencias significativas ($P=0.001$), con valores de F_v/F_m de 0.6 y 0.8 para Maradol y Silvestre, respectivamente. Respecto al, índice de PI_{abs} reveló valores de 1.9 en el genotipo Maradol, valor más bajo que el genotipo Silvestre con valores de 4.2. Este resultado nos indica que el genotipo Silvestre mantuvo mayor eficiencia de luz absorbida por el complejo antena o en el

rendimiento cuántico de transporte de electrones para la funcionalidad de los fotosistemas, bajo estrés por choque térmico (Figura 4B y E). En cuanto, al tratamiento de recuperación los datos de Fv/Fm debido a la poca sensibilidad o daño que presentó bajo estrés, en recuperación regreso a valores de 0.8, en ambos genotipos. Respecto, al índice PI_{abs} los genotipos Maradol y Silvestre fueron capaces de recuperar sus valores similares al control de 8.6 y 7.7, respectivamente (Figura 4.4C y F).

En lo que respecta, al tratamiento de estrés por déficit hídrico (SQ) (suspensión de riego por 14 días), los valores de Fv/Fm del mismo modo se mantuvieron semejantes a aquellos en condiciones control, ambos con valores de 0.83 de Fv/Fm, en los genotipos Maradol y Silvestre. En respuesta a déficit hídrico hubo diferencias significativas entre los dos genotipos en el índice PI_{abs} , con valores muy cercanos al tratamiento control (PI_{abs} de 7) aunque el genotipo Silvestre mostró valores mayores que el genotipo Maradol (Figura 4.4B, E). No obstante, después del periodo de recuperación, ambos genotipos fueron capaces de recuperar los valores de Fv/Fm y su índice PI_{abs} , en este sentido el genotipo Silvestre superó los valores control de PI_{abs} con 8.1, después de 7 días con reintegración del riego y Maradol mostró valores de PI_{abs} ligeramente menores que el genotipo Silvestre.

En definitiva, el tratamiento más severo de estrés que consistió en déficit hídrico durante 14 días más un choque térmico de 50 °C durante dos horas, presentó disminución considerable en la fluorescencia de clorofila en el genotipo Maradol (Fv/Fm con valores de 0.47), pero en el genotipo silvestre se presentaron valores de 0.70; del mismo modo el índice PI_{abs} más bajo observado fue en el genotipo Maradol con valores de 0.3 mientras que en el genotipo Silvestre fue de 1.7 (fue el segundo valor más bajo, analizado). En lo que respecta al tratamiento de recuperación, ambos genotipos fueron capaces de recuperar su Fv/Fm con valores de 0.8 y el valor PI_{abs} en el genotipo Maradol fue de 5.7 y en Silvestre fue de 6.0, lo que sugiere que el genotipo Silvestre tiene una mayor o más rápida capacidad de recuperación. Estos resultados, indican que, a pesar de ser este último el estrés más severo, las plantas, presentaron alteraciones, pero no daño en el fotosistema II. En particular, resultó más sensible al estrés el parámetro de índice de rendimiento (PI_{abs}) que el de Fv/Fm.

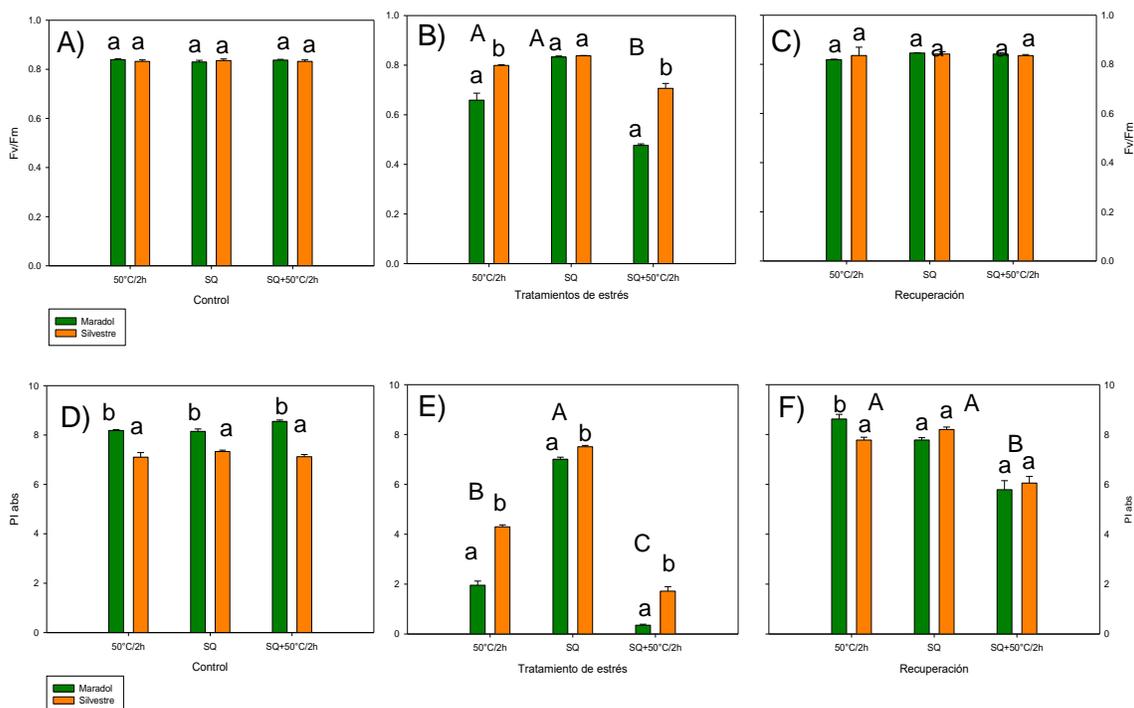


Figura 4.4 Fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) e índice de rendimiento PI_{abs} de dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico, sequía y choque térmico más sequía. A, D) Plantas control, B, E) Plantas con tratamientos de estrés y C, F) Plantas que después del estrés, fueron reincorporadas a condiciones control durante 168 h. Las barras representan la desviación estándar de cinco réplicas. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre genotipos y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.4 Cuantificación del rendimiento de fotosistema II mediante las curvas OJIP

La precisión, la toma de datos no destructivos y la posibilidad de analizar una gran cantidad de muestras en un corto período de tiempo, favorecen a que la determinación de la fluorescencia de clorofila se convierta en una excelente herramienta para el análisis de aspectos de la fotosíntesis y del estado saludable de las plantas en respuesta a la magnitud del estrés por déficit hídrico, por temperatura o una combinación de ambos. Sin embargo, un análisis más completo es mediante el análisis de un aumento de fluorescencia que consiste en una secuencia de fases de tiempo y de intensidad de luz indicadas con las letras (O, J, I y P), en este análisis, es posible obtener información sobre el flujo de energía a través de todo el aparato fotosintético o sobre puntos específicos del fotosistema II tanto en el centro de reacción (R_C) como en la sección transversal excitada (C_S) (Sasi *et al.*, 2018; Živčák *et al.*, 2008).

En un estado adecuado de la planta, absorbe fotones por los pigmentos fotosintéticos (carotenoides, clorofila b, clorofila a) del complejo antena, lo que conduce a la formación de clorofilas excitadas, el complejo antena, transfiere la energía de excitación a los centros de reacción PSII (P680) y PSI (P700) para iniciar el proceso de transferencia de electrones. Las cargas positivas (protones, Mn_4O_5Ca) producidas por PSII oxidan las dos moléculas de agua para producir 4 electrones, cuatro protones y un oxígeno en el complejo de liberación de oxígeno a través de YZ (tirosina-161 en la proteína D1). La carga negativa se localiza primero en una molécula de feofitina (Phe), y luego se pasa a la quinona primaria (Q_A), que es un receptor de dos electrones; el Q_B es reducido, después de que se protona para convertirse en plastoquinol (PQH_2). La plastocianina (PC) es una proteína que contiene cobre y transfiere electrones del complejo citocromo: Cyt b6f al PSI para la producción de NADPH y ATP (Küpper *et al.*, 2019; Stirbet y Govindjee, 2011).

En este sentido, el transitorio de fluorescencia pasa de la intensidad de fluorescencia inicial F_0 que se indica como el paso O a aproximadamente 50 microsegundos (μs), relacionado con el cierre de centros de reacción de PSII a la acumulación de Q_A (aceptor de quinona primaria reducida) y la tasa de reoxidación de Q_A por Q_B . La letra J a aproximadamente 2 milisegundos (ms) y el paso a la letra I a aproximadamente 30

milisegundos (ms) corresponden a la reducción del aceptor de electrones secundario Q_B , plastoquinona (PQ), citocromo y plastocianina (PC) y la letra P a aproximadamente 500 ms, las letras I y P están asociadas con la reducción de los transportadores de electrones ferredoxina, aceptadores intermedios y NADP del lado aceptor de PSI (Mlinarić *et al.*, 2017; Kalaji *et al.*, 2016).

En este contexto, nuestros grupos control en ambos genotipos Maradol y Silvestre, no fueron significativamente diferentes e indicaron la señal de fluorescencia alcanzada inmediatamente al inicio de la iluminación como se indica en la etiqueta O, la curva aumenta rápidamente a un pico P, que representa el valor máximo, el cual indica eficiencia de transporte y captura de electrones en el sistema del aparato fotosintético para lograr la oxidación del agua, producción de NADPH, ATP y eficiencia en la asimilación de dióxido de carbono (CO_2) (Figura 4.5A).

Como es evidente en la Figura 4.5, el estrés por calor (Figura 4.5B), estrés por sequía (Figura 4.5E) y estrés combinado (Figura 4.5H), condujeron a disminución de F_0 respecto al control en los dos genotipos de papaya. Sin embargo, no esperábamos que la forma de la curva disminuyera drásticamente a lo largo de las curvas OJIP en los dos genotipos y los tres tipos de estrés. Respecto al tratamiento de estrés por choque térmico, desde O inició más bajo que el control, con los mismos valores para ambos genotipos, a los 2 milisegundos (ms) el flujo de electrones fue más drástico, con diferencias significativas en ambos genotipos, con menor eficiencia de flujo de electrones en el cv. Maradol con relación al genotipo silvestre. Después de 7 días post estrés, las plantas del genotipo Maradol mostraron un patrón de recuperación más bajo que el del genotipo Silvestre, no iguales al tratamiento control, pero si con valores mayores que el estrés térmico.

Observamos que los transitorios del fotosistema II, son más susceptible a las condiciones de estrés hídrico en los dos genotipos evaluados (Figura 4.5E), presentando un aumento en el número de centros Q_B no reductores (no podrán donar electrones) y una posible alteración en el complejo de liberación de Oxígeno, que conduce a una donación menor de protones para el intercambio en el complejo citocromo y la posible inactivación de ATP para la producción de azúcares a través del ciclo de Calvin. Interesante en el tratamiento de recuperación los parámetros fotoquímicos se recuperaron, pero no tan notables como el tratamiento de recuperación térmico. Es decir, los valores en esta etapa de recuperación

fueron muy cercanos a los obtenidos al aplicar el estrés por déficit hídrico y muy por debajo de los valores control.

Interesante mostrar, que el transitorio polifásico típico se vio significativamente afectado a estrés combinado en *Carica papaya* L. Se puede observar en la forma de la curva OJIP del tratamiento de estrés combinado Figura 4.5H, una reducción drástica en el rendimiento y la eficiencia de captura de electrones, logrando la pérdida parcialmente de la forma de la curva polifásica. Además, las plantas expuestas a este estrés combinado tuvieron los valores de fluorescencia más bajos al final de la etapa P, en especial el genotipo Maradol, pérdida que le quita la estabilidad en la producción de CO₂ para la generación de carbohidratos necesarios para el correcto funcionamiento. Nuevamente, el genotipo Silvestre fue el menos afectado en respuesta a estrés térmico y combinado. A pesar de la alteración, en la curva de la figura 4.5I, mostramos que, después de 7 días de la aplicación del estrés combinado, las plantas se recuperaron con valores interesantes, pero nunca cercanas a los del tratamiento control. Por ende, el daño fue reversible y sugerimos que se debe a que el daño fue mayor en el lado donante en lugar del aceptor de PSII. Para comprobar con más detalle, se propone la evaluación de más días de recuperación en papaya para conocer si en efecto no hay un daño no reversible.

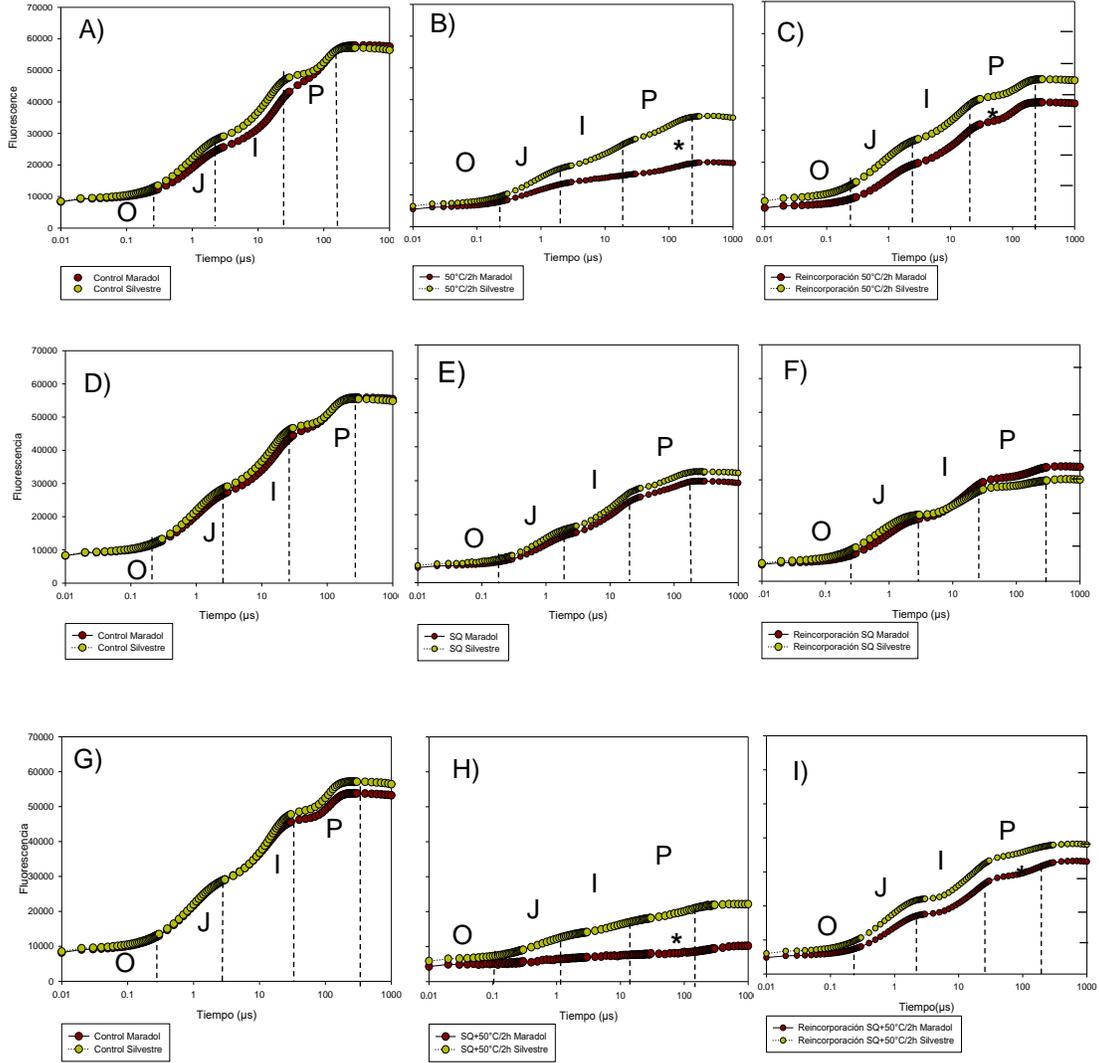


Figura 4.5 Representación cinética de los transitorios de fluorescencia (OJIP) de hojas de plantas de *Carica papaya* cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés abiótico. A, D, G) Plantas control, B) Plantas expuestas a choque térmico 50 °C durante 2 horas, C, F, I) Plantas reincorporadas a condiciones iniciales (de temperatura y riego), E) Plantas expuestas a sequía durante 14 días y H) Plantas expuestas a sequía más choque térmico. Las hojas se adaptaron a la oscuridad durante 30 min. Las señales son: la intensidad de fluorescencia O (a 50 μ s); las intensidades de fluorescencia J (2 ms), I (a 30 ms) y el pico P (500 ms) más alto en la curva representa la fluorescencia máxima (F_m). Asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos en los tratamientos de estrés, según Tukey ($p \leq 0.05$), $n=5$. entre genotipos en los tratamientos de estrés.

4.4.5 Fuga de iones en plantas de *Carica papaya* L. en respuesta a estrés abiótico

Las membranas celulares son uno de los componentes más sensibles al estrés ambiental en la célula de la planta, ya que conducen la pérdida de solutos orgánicos e inorgánicos (electrolitos) de la célula. El porcentaje de daño por exposición a estrés ambiental basada en la pérdida de electrolitos de la célula es buen predictor de la tolerancia de la planta, es un método fiable y fácil de realizar, que se fundamenta de mediciones conductométricas (Sanabría *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2003).

En la Figura 4.6A se observa que el porcentaje de fuga de electrolitos para los grupos control de ambos genotipos fue del 8%. Por otra parte, los resultados obtenidos en los grupos expuestos a los tratamientos por choque térmico indican mayor afectación a nivel membrana, en el genotipo Maradol que en el genotipo Silvestre con valores de 19% y 17%, respectivamente (Figura 4.6B). Una vez que se incorporó a temperatura control durante 7 días, la fuga de electrolitos disminuyó considerablemente en el genotipo silvestre con valores de 9% mientras que el genotipo Maradol presentó valores de 11%. Las plantas en recuperación volvieron a los valores cercanos al control, lo que sugiere la presencia de daños reversibles principalmente como resultado de cambios en las propiedades de la membrana.

Ante la suspensión del riego durante 14 días, el porcentaje de fuga de electrolitos fue menor con respecto al tratamiento de choque térmico, las plantas de los genotipos presentaron diferencias significativas, el genotipo Silvestre mostró valores de 9% en comparación con Maradol que tuvo una afectación de 12%. Interesante, una vez que se reincorporó el riego durante una semana, el porcentaje de fuga de electrolitos disminuyó, con diferencias significativas entre ambos genotipos (Figura 4.6C).

Respecto al tratamiento más severo (sequía+choque térmico) el % de fuga de electrolitos se disparó, para las plantas Maradol a valores de 66% y para Silvestre fue de tan solo 54%. Después de reincorporado el riego y la temperatura control durante una semana, el porcentaje de fuga de electrolitos disminuyó en ambos casos a valores cercanos al control. Los datos obtenidos indican que, para ambos genotipos, el porcentaje de fuga de iones fue más susceptible al tratamiento por choque térmico, pero afectó aun más al combinado de sequía más choque térmico, lo que indica una

correlación positiva entre el nivel de estrés y el daño en membrana. De igual forma, se observó que el daño en membrana fue mayor para el genotipo Maradol. Lo que indica que la membrana de las plantas Maradol es más susceptible en estrés severo en comparación con el tipo Silvestre, donde se observó que una vez reincorporado el riego se disminuyó el daño en membrana. Además de los cambios en el índice de PI_{abs} , la fuga de iones es un indicador importante del grado de estrés con base a nuestros resultados.

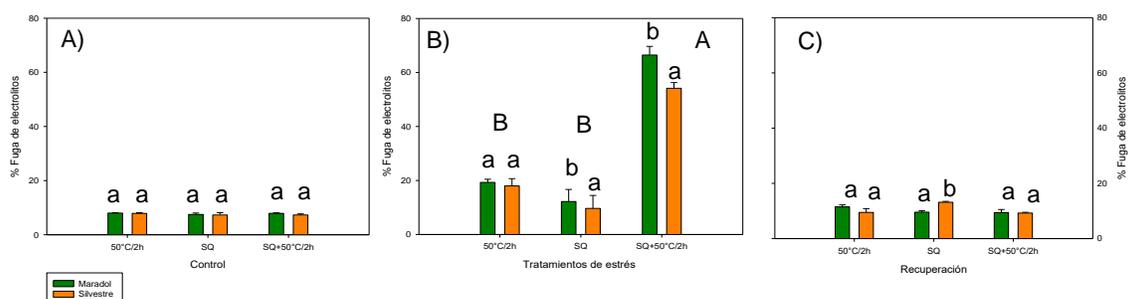


Figura 4.6 Fuga de electrolitos de dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h), sequía (SQ) y choque térmico más sequía (SQ +50 °C/2 h). A) Plantas control, B) Plantas con tratamientos de estrés y C) Plantas reincorporadas a condiciones iniciales (control) durante 168 h. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre genotipos y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.6 Fotosíntesis (Pn), Conductancia Estomática (g_s), CO₂ intercelular (C_i) y Transpiración (E).

Los resultados obtenidos del intercambio de gases para los grupos control están representados en la Figura 4.7A. Respecto a la fotosíntesis el genotipo Silvestre inicia con mayor tasa fotosintética que el genotipo Maradol con valores de 6 y 5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sin diferencias estadísticas, respectivamente. En cuanto a la conductancia estomática los tres tratamientos en condiciones control mostraron un valor promedio de 0.13 $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para el genotipo Maradol y para el genotipo Silvestre de 0.18 $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La concentración interna de CO₂ intercelular fue mayor en el genotipo silvestre en comparación del genotipo Maradol con valores promedio de 315 y 304 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente. Por lo tanto, la tasa inicial de transpiración fue mayor en el genotipo Silvestre en contraste con el genotipo Maradol con valores promedio de 2.23 y 1.90 $\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Una vez iniciado el tratamiento de estrés térmico, se observó mayor afectación de la actividad fotosintética con diferencias estadísticas entre genotipos ($P=0.03$), en el genotipo Maradol con valores de 3.95 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que el genotipo Silvestre prácticamente se mantuvo, con la Pn inicial en valores cercanos al control de 5.97 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Interesante, observar en el tratamiento de estrés por déficit hídrico inhibición total en la tasa fotosintética (Pn, CO₂ asimilado-CO₂ generado), por lo que se sugiere que Rubisco actuó como oxigenasa en lugar de carboxilasa, incrementando la respiración, de modo que el genotipo comercial presentó valores de -1.96 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en lo que respecta al genotipo Silvestre fue de -1.70 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Del mismo modo, en nuestro tratamiento de estrés más severo que consistió en 14 días sin riego más dos horas de choque térmico a 50 °C, el genotipo Maradol se vio más afectado (incremento en la respiración), que el genotipo Silvestre con valores de -2.21 y -1.43 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Figura 4.7B). Después de reincorporado el riego y la temperatura, la Pn de las plantas se recuperó a valores iniciales promedio de 5.74 y 6.26 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para Maradol y Silvestre, respectivamente (Figura 4.7C).

Por ende, la conductancia estomática en condiciones de estrés por choque térmico aumentó considerablemente en el genotipo Maradol con valores de 0.34 y el genotipo Silvestre con valores 0.15 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹ prácticamente presentó los mismos valores que en el control (Figura 4.7D). En forma similar, la conductancia estomática derivada del tratamiento de estrés por déficit hídrico causó disminución importante, mucho mayor que el tratamiento por choque térmico, ligeramente mayor en el genotipo Maradol con valores de 0.0032 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹ que en el genotipo Silvestre con valores de 0.0019 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹. Nuestro tratamiento más severo (sin riego más choque térmico) fue el tratamiento con menor conductancia estomática de los tres tratamientos de estrés, con valores de 0.0024 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹ para Maradol y para Silvestre con valores de 0.0014 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹ (Figura 4.7E). En la etapa de recuperación después de 7 días a 25 °C y con riego, las plantas mostraron una recuperación de la conductancia estomática con valores cercanos a aquellos observados en las plantas control (Figura 4.7F).

De esta manera, en respuesta a choque térmico, la tasa de transpiración presentó los valores más altos, de los tres tratamientos, con valores de 4.41 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ y 2.76 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ en los genotipos Maradol y Silvestre, respectivamente. Sin embargo, una disminución de la transpiración se observó en la respuesta a déficit hídrico en el genotipo comercial con valores de 0.066 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ de igual forma con el genotipo Silvestre donde su transpiración fue ligeramente menor con datos promedio de 0.040 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. Con lo que respecta al tratamiento severo de estrés (sequía + 50 °C por 2 h), la transpiración del genotipo silvestre de igual manera fue menor que la del genotipo Maradol con valores de 0.028 y 0.049 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, respectivamente (Figura 4.7H). En la fase de recuperación, el tratamiento por choque térmico generó valores semejantes a aquellos en condiciones control. Mientras que el estrés por sequía y el combinado de temperatura-riego, generaron valores de transpiración ligeramente menores a aquellos observados en las plantas en condición control (Figura 4.7I).

En cuanto a la concentración de carbono (CO₂ intercelular) en condiciones de estrés por choque térmico, se observó una concentración de carbono en el genotipo comercial con valores de 353.4 μmol CO₂·mol⁻¹ en comparación con el genotipo Silvestre con valores de 243.7 μmol CO₂·mol⁻¹. En consecuencia, al estrés por déficit hídrico, a diferencia del tratamiento de estrés anterior, nuestros datos muestran mayor concentración de CO₂ en

el genotipo Silvestre con valores de $2307.1 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ y en el genotipo Maradol se observaron valores de $1458.7 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$. El mismo efecto presentaron los genotipos en respuesta a nuestro tercer tratamiento de estrés (combinado), con una capacidad de concentración de CO_2 de $2728.9 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ en el genotipo Maradol y en el genotipo Silvestre sorprendentemente una concentración de $4388.45 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ en respuesta a estrés severo (Figura 4.7K). En la fase de recuperación las plantas de los tres tratamientos y en los dos genotipos, mostraron valores similares a los observados en las plantas controles (Figura 4.7L).

Las plantas en tratamiento de choque térmico, estrés hídrico y el combinado (hídrico más temperatura), después de aplicado dichos tratamientos y se re-incorporaron a buen riego y temperatura (sus condiciones iniciales) después de 7 días, los dos genotipos fueron capaces de recuperar sus valores de fotosíntesis (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), mientras la conductancia estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mostraron valores mas bajos que en sus condición inicial.

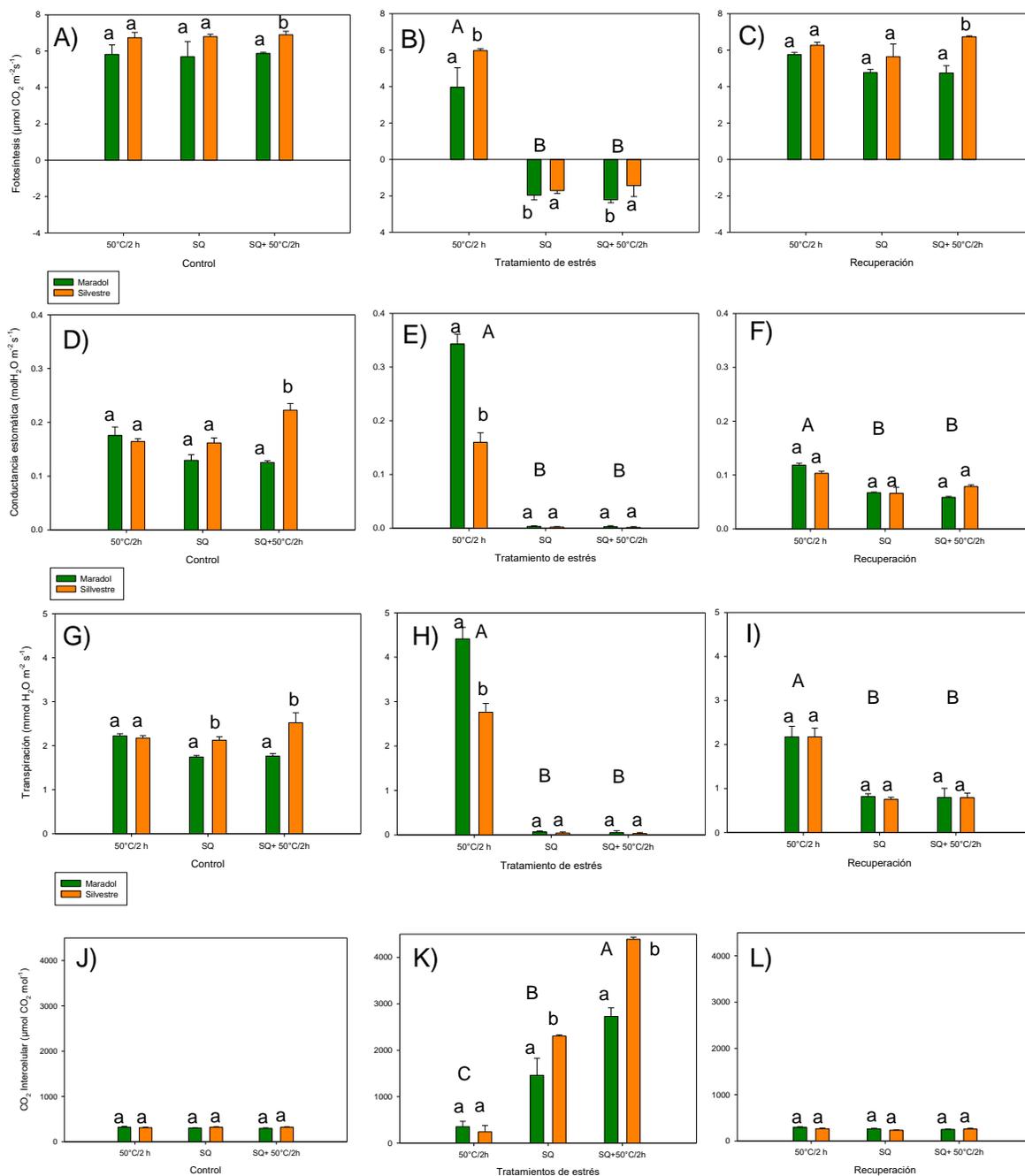


Figura 4.7 Intercambio de gases de dos genotipos de *Carica papaya* L Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h), sequía (SQ), choque térmico más sequía (SQ +50 °C/2 h). A, D, G, J) Plantas control. B, E, H, K) Plantas con tratamientos de estrés y C, F, I, L) Plantas reincorporadas a condiciones control durante 168 h. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre genotipos y letras mayúsculas diferentes entre tratamientos de estrés, Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.7 RNA en plantas de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre

Hasta este momento, con la caracterización fisiológica, nuestros datos sugieren que las plantas de *Carica papaya* L. tienen mecanismos diferentes para enfrentar el estrés térmico y el estrés hídrico. Interesante en respuesta a estrés combinado, algunos mecanismos de respuesta son similares a los de estrés hídrico (los relacionados a la parte de Pn, pero no los relacionados con fluorescencia), de modo que el tratamiento combinado es el que muestra mayor afectación en los genotipos evaluados. De manera general, según los parámetros evaluados (fisiológicos y de crecimiento), los valores de los mismos y el tiempo de recuperación, las plantas silvestres muestran mayor tolerancia a los tres tipos de estrés. Es posible que algunos genes estén involucrados en esta respuesta de la planta a estos tipos de estrés. Por ello, nos formulamos, las siguientes preguntas: ¿Los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 están involucrados en el mecanismo de tolerancia del genotipo Silvestre? ¿Estos genes, se expresan en los tres tratamientos de estrés?.

Para ello, inicialmente, se realizaron las lecturas de RNA, de hojas de plantas jóvenes de *Carica papaya* L., correspondientes a cada tratamiento de estrés, las muestras fueron previamente tratadas con DNAasa y los resultados obtenidos de la extracción de RNA se muestran en el cuadro 4.1. Importante que, en todos los casos, los índices de pureza de RNA obtenidos en los diferentes tratamientos mostraron valores de absorbancia 260/280 de 1.93 a 2.0 y de A260/230 de 1.98 a 2.14 en ambos genotipos, rangos que indicaron muestras con alta pureza para continuar con la evaluación de expresión de los genes HSF.

Se observó que el rendimiento de RNA del tratamiento control fue mayor en el genotipo silvestre con 382.88 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ en relación con el genotipo Maradol que mostró 342.85 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$. Sin embargo, el rendimiento del tratamiento térmico en Maradol superó al tratamiento control (804.51 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$) por otro lado, el rendimiento del genotipo Silvestre disminuyó en respuesta a estrés térmico (224.44 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), en relación con el rendimiento en los tratamientos control. Después de colocar las plantas a recuperación (ARP) ambos genotipos mostraron rendimientos superables al tratamiento control con valores de 922.28 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ y 443.85 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ para Maradol y Silvestre, respectivamente.

Respecto al tratamiento de estrés hídrico, se observó una reducción interesante en el rendimiento del genotipo Maradol con valores de 318.30 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$, mientras que el genotipo Silvestre se mantuvo el valor cercano al rendimiento de estrés térmico de 224.06 $\mu\text{g RNA/g PF}^{-1}$. Por otro lado, los rendimientos del tratamiento recuperación disminuyeron en ambos genotipos con valores de 276.43 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ y 172.04 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$, para los genotipos Maradol y Silvestre, respectivamente.

Por último, en respuesta a estrés combinado (hídrico más térmico), el rendimiento del RNA Maradol fue el más bajo de todos los tratamientos evaluados (125.68 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), y el rendimiento del genotipo Silvestre fue mayor al resto de tratamientos 598.53 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$. Respecto al tratamiento de recuperación, el genotipo Maradol presentó rendimiento de 344.5 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$ y el genotipo Silvestre presentó valores de 263.40 $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$. De los resultados, descritos anteriormente es interesante que la concentración de RNA del genotipo Silvestre en el tratamiento con más afectaciones fisiológicas: estrés por déficit hídrico más estrés térmico, haya aumentado, Barber *et al.* (1994), ha correlacionado que la concentración de RNA más alta implica niveles aumentados de la síntesis de proteínas, por otro lado, la concentración de RNA del cv. Maradol disminuyó considerablemente, como lo ocurrido en hojas de maní, entre mayor concentración de polietilenglicol (PEG-600), el contenido de RNA, la concentración de clorofila y el contenido relativo de agua (RWC), se redujo significativamente (Meher *et al.*, 2018). Algunos otros autores señalan estos atributos como herramienta de detección de tolerancia a estrés abiótico.

Tabla 4.1 Cuantificación de RNA ($\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$), extraído de tejido de hojas de plantas jóvenes de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre expuesta a estrés abiótico (sequía y choque térmico); plantas control (CT), A (plantas expuestas a 50 °C durante 2 horas), B (plantas expuestas a sequía), C (plantas expuestas a sequía más 50 °C durante 2 horas), y RP (después de 7 días de recuperación para cada uno de los tratamientos mencionados).

Maradol	ng/ μL	A260/280	A260/230	Rendimiento $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$	Silvestre	ng/ μL	A260/280	A260/230	Rendimiento $\mu\text{g RNA gPF}^{-1}$
CT	1257.1	1.93	2.0	342.85	CT	1506	1.90	2.17	382.88
A	3003.5	1.93	1.98	804.51	A	808	1.98	2.21	224.44
B	1156.5	1.96	2.0	318.30	B	1142.7	1.97	2.24	224.06
C	427.3	1.98	2.12	125.68	C	1995.1	1.96	2.21	598.53
A _{RP}	3105	1.92	2.11	922.28	A _{RP}	1819.8	1.91	2.25	443.85
B _{RP}	1280.8	1.95	2.11	276.43	B _{RP}	814.3	1.99	1.92	172.04
C _{RP}	1608	1.90	2.14	344.5	C _{RP}	1106.3	1.99	2.27	263.40

Posteriormente, en la Figura 4.8, se muestra la integridad de las subunidades de RNA ribosomal, se visualizaron las bandas en geles de agarosa para mostrar la confiabilidad del RNA mediante el análisis de las bandas ribosómicas 28S y 18S; la ausencia individual o dual sugiere la degradación del RNA.

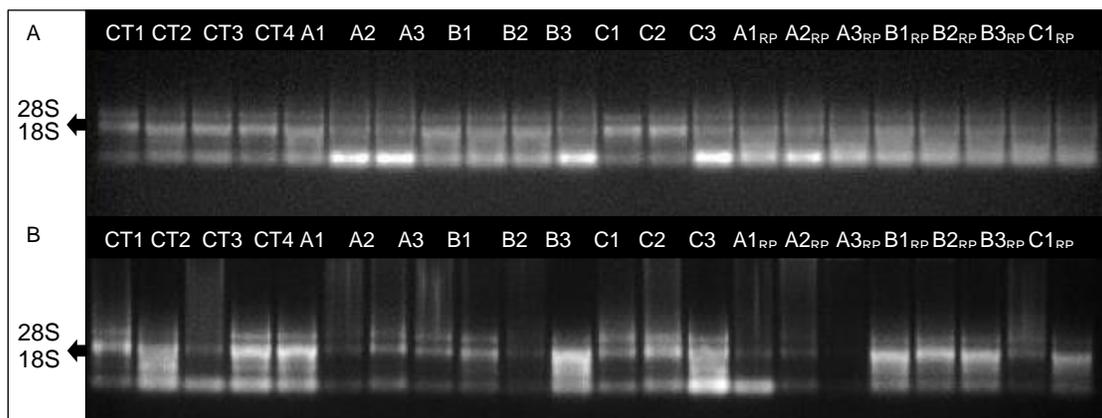


Figura 4.8 Unidades ribosomales (28S y 18S) de RNA extraído de tejido de hoja de plantas jóvenes de *C. papaya* L. A) Maradol y B) Silvestre. Se muestran tres replicas por tratamiento, plantas control (CT), plantas expuestas a 50 °C durante dos horas (A), plantas expuestas a sequía (B), plantas expuestas a 50 °C durante dos horas más sequía (C) y un tiempo de recuperación para cada tratamiento (ARP, BRP, CRP). Electroforesis de 90 V, 400 A durante 30 minutos en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de Etidio.

4.4.8 Validación de los oligonucleótidos para RTq-PCR

Para sustentar la estandarización de los ensayos de tiempo real, se tomó como base la curva de disociación o curva melting en donde se puede observar un único pico de amplificación (Figura 4.9). Se encontró que la mejor temperatura de hibridación, donde la fluorescencia pasa el umbral de ciclo (Ct) más rápido y alcanza la intensidad más alta entre las temperaturas ensayadas fue de 60 °C para todos los tres genes evaluados en este capítulo (CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3). Al igual que en el PCR punto final, en las corridas de PCR tiempo real se deben añadir controles negativos (H₂O libre de DNAasa) y controles positivos. Para obtener resultados certeros, cada muestra se procesa por triplicado, resultados que se muestran en la curva estándar donde se gráfica con el logaritmo de cada concentración conocida en las diluciones (eje X) contra el valor de Ct para cada concentración (eje Y) mostraron un coeficiente de correlación (R²) muy cercanos a 1 y una eficiencia ideal debe ser del 90%-110%, lo que significa que el DNA molde se duplica después de cada ciclo térmico durante la fase exponencial.

Como puede verse en la figura 4.9A, el rango lineal de CpEF1 α del ensayo abarca las 5 primeras diluciones y el control positivo, con un valor R² igual a 0.993. La eficiencia de la reacción de amplificación en el rango lineal del ensayo fue del 95.8%, lo que está dentro de los márgenes establecidos en el laboratorio (Figura 4.9A y B). Una vez validado el gen de referencia CpEF1 α y con la certeza de que se estaba amplificando un solo producto correspondiente al producto de interés; se prosiguió a realizar las diluciones con tres replicas con las mismas condiciones de los genes que resultaron de interés en la PCR en punto final (Capítulo III). La eficiencia de la reacción del gen CpHsfA1d fue de 104.5%, con un valor R² de 0.98, de este modo la eficiencia de la reacción también se encontró dentro de los parámetros deseados (Figura 4.9 C y D). Los productos específicos amplificados presentan una temperatura de 79 °C, con ausencia de pico de melting en el control negativo e importante que la curva de disociación del producto amplificado no presenta dímeros. De modo, que la eficiencia de la reacción de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 fue de 91.7 y 102.5%, respectivamente. Los valores de las diluciones se portaron cercanos a la curva con una R² igual a 0.9 en ambos genes, en las curvas melt podemos observar los productos específicos amplificados a una temperatura (T°) de 79 °C (Figura 4.9E y H).

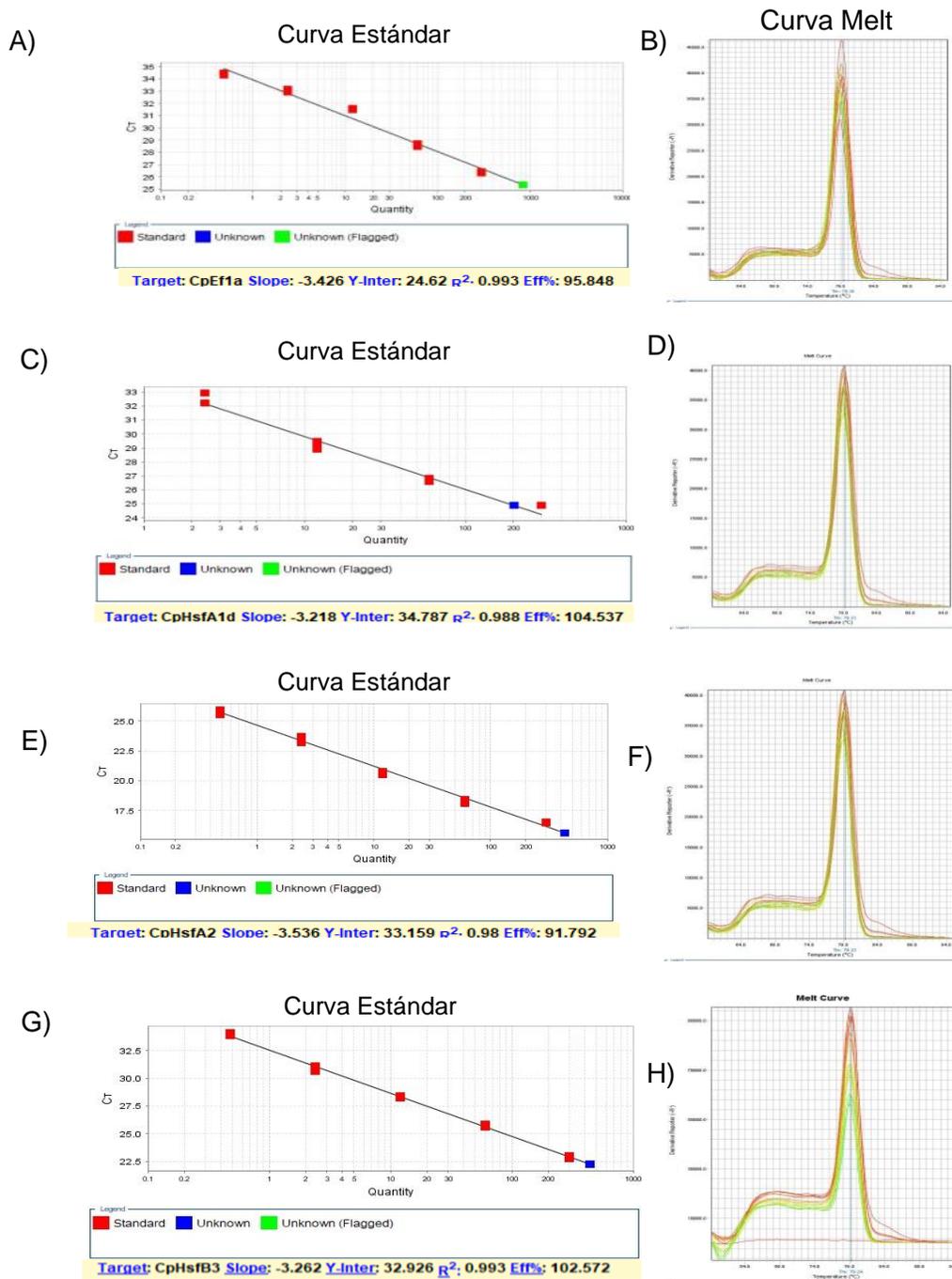


Figura 4.9 Curva estándar y Curva Melt, los valores de Ct se muestran en los cuadros rojos de las 5 diluciones del DNA, cada punto con sus correspondientes tres réplicas en muestras de hojas del genotipo silvestre, tiempo de estrés 14 días. A, B) Gen de referencia (CpEF1 α), C, D) Gen CpHsfA1d, E, F) Gen CpHsfA2 y G, H) Gen CpHsfB3.

4.4.9 Análisis de expresión de los factores de transcripción HSF en respuesta a estrés abiótico

Para comprender el papel de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en respuesta a estrés abiótico, en *Carica papaya* L., cuantificamos los niveles de expresión relativa en tratamientos de estrés por déficit hídrico, choque térmico, y por último en tratamiento de déficit hídrico más choque térmico; con sus respectivos controles, en tiempos de estrés severo y en tiempos de recuperación de una semana, en los dos genotipos estudiados, uno considerado tolerante (Silvestre) y uno susceptible (Maradol).

Los resultados mostraron que en condiciones control, los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 se encuentran en niveles de expresión relativa <1. Se sabe que el gen HsfA2 requiere al gen HsfA1a para su localización nuclear (Kotak *et al.*, 2004). En tomate el gen LeHsfB1 es nuclear, LeHsfA1 se distribuye entre el citoplasma y el núcleo, y el gen LeHsfA2 por si solo se encuentra en el citoplasma (Heerklotz *et al.*, 2001), sin embargo, poco se sabe de la distribución después de estrés hídrico y térmico por lo que se requieren más estudios para conocer el efecto de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 sobre la distribución nucleocitoplasmática.

El papel de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 es fundamental en la respuesta a choque térmico, sin embargo, el gen CpHsfA2 fue el dominante a altas temperaturas, debido a que se expresó 336 veces más que en el tratamiento por déficit hídrico, en el genotipo Silvestre. Mientras que el gen CpHsfA1d se expresó 4 veces más que en el tratamiento por déficit hídrico, en el tipo silvestre. El gen CpHsfB3 disminuyó ligeramente su expresión comparada con su expresión en respuesta a estrés hídrico, lo cual puede indicar que el gen CpHsfB3 responde a estrés por déficit hídrico y por choque térmico. En cuanto al genotipo Maradol, la expresión de los tres genes fue menor, que en el genotipo Silvestre. Al reincorporar el tratamiento a condiciones control, observamos que el genotipo Maradol presento mayor expresión en el gen CpHsfA1d que en el genotipo silvestre. Mientras que los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 en cv. Maradol, no tienen cambio en sus valores de expresión (valores muy bajos de expresión) en comparación al genotipo Silvestre.

En respuesta a déficit hídrico (SQ), las plantas silvestres presentaron niveles de expresión altos en los tres genes (CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3). De manera

sorprendete, de acuerdo con el nivel de estrés el gen CpHsfB3 tiene una mejor respuesta al estrés por déficit hídrico en *Carica papaya* L con un valor promedio de 17.34. Mientras que el gen CpHsfA1d presenta expresión en menor nivel de 2.84. El gen CpHsfA2 también mostró una baja expresión en respuesta al estrés por déficit hídrico debido a que su nivel de expresión fue muy similar al tratamiento control con 1.05. Al reincorporar el riego, el gen CpHsfB3 bajo su expresión a valores menores a uno. Mientras el gen CpHsfA2 mantuvo su expresión baja al igual que en el tratamiento de estrés combinado (SQ+50 °C/2 h). El gen CpHsfA1d, redujo su expresión con respecto al máximo estrés. En cuanto al genotipo comercial, los niveles de expresión de los tres genes, en promedio fue de 0.021, valores que indican que estos genes tienen una muy baja expresión en este genotipo. En el tratamiento de recuperación en los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 se incrementa su expresión ligeramente. Mientras que el gen CpHsfB3 en el tiempo de recuperación tiene una expresión relativa de 0.05.

Por último, en el tratamiento de sequía más choque térmico, en respuesta al máximo estrés, los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 aumentan su expresión en el genotipo Silvestre, con los valores más alto de todos los genes en todos los tratamientos, en contraste con el genotipo cv. Maradol. Sin embargo, el gen CpHsfA2 en el genotipo Silvestre responde en mucho mayor medida, es decir, es 2,391 veces más alto que en el tratamiento de déficit hídrico y choque térmico, de igual forma, tuvo una mayor expresión en los diferentes tratamientos (control y recuperación), y en comparación con el genotipo Maradol. Patrón que se repitió en el gen CpHsfA1d con valores de expresión de 7 veces de los tratamientos anteriores. Después de someter las plantas estresadas a condiciones control, los niveles de expresión relativa fueron a la baja con valores cercanos al control en los tres genes evaluados, en el genotipo silvestre y en el cv. Maradol. Lo que demuestra que estos genes son responsivos a estrés por déficit hídrico, choque térmico y al estrés combinado.

Los resultados mostraron que, en todos nuestros tratamientos de estrés, los niveles de expresión de los genes CpHsf analizados fueron ampliamente más altos en el genotipo silvestre que en el cv. Maradol. En general, parece que la regulación por sequía es específica de la clase CpHsfB3, posiblemente regulando corriente abajo los genes de la clase A. Mientras que el gen CpHsfA2 es altamente regulado, no por estrés hídrico, pero

si por choque térmico y en forma importante por la suma del estrés hídrico más choque por calor en el tiempo de máximo estrés, la respuesta de la expresión de este gen es el más alto observado. Reforzando que, este gen CpHsfA2 tiene una importante respuesta en estrés por alta temperatura, como se observa en el genotipo silvestre.

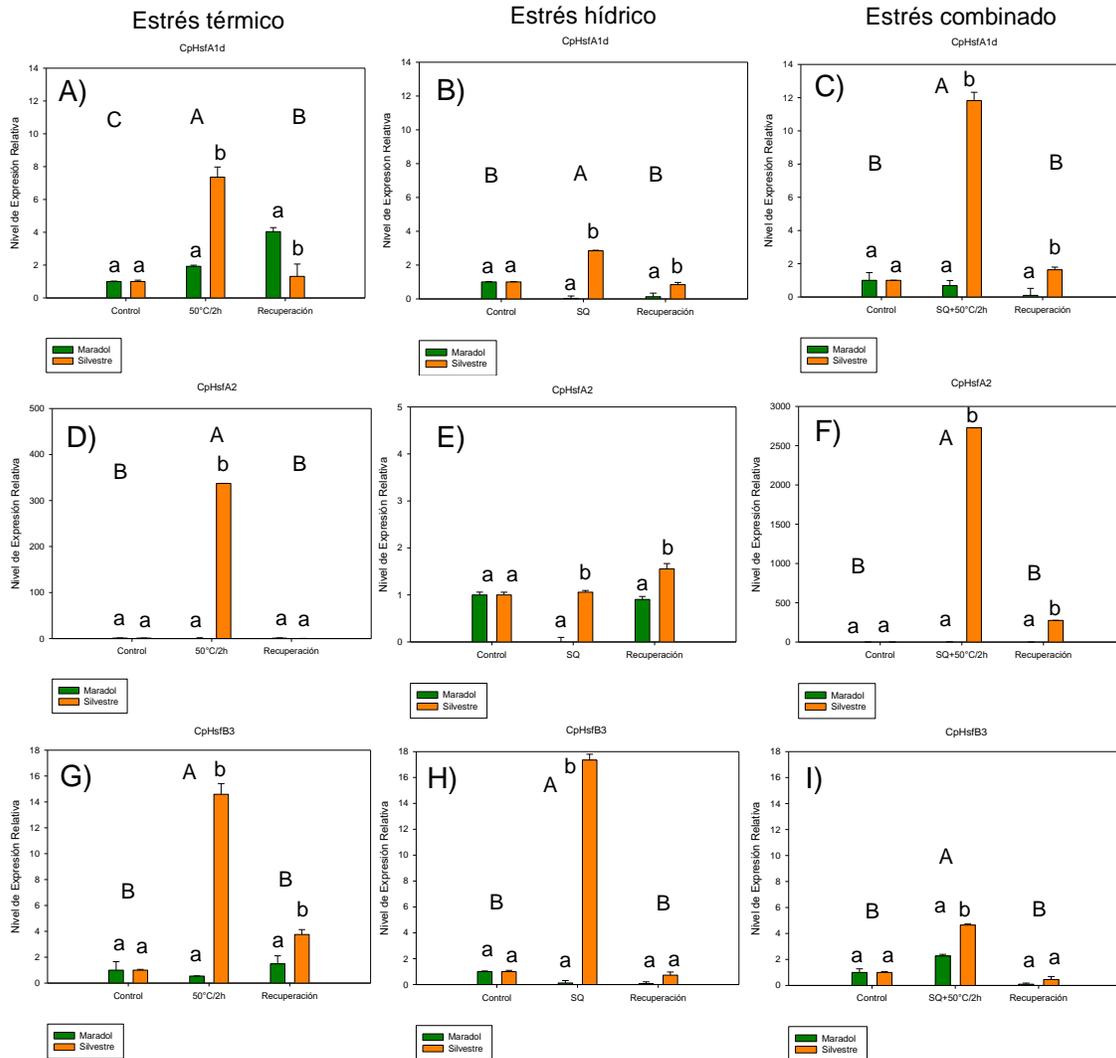


Figura 4.10 Niveles de expresión relativa de los genes HSF en papaya: CpHsfA1d (A, B, C), CpHsfA2 (D, E, F) y CpHsfB3 (G, H, I), en respuesta a estrés abiótico en dos genotipos de *Carica papaya* L., cv. Maradol y Silvestre. En respuesta a choque térmico durante dos horas a una temperatura de 50 ± 2 °C (A, D, G), déficit hídrico durante 14 días (B, E, H), y déficit hídrico durante 14 días más dos horas a una temperatura de 50 ± 2 °C (C, F, I). En plantas en condiciones control, en los diferentes tratamientos y tiempo de reincorporación de 7 días en todos los tratamientos a condiciones control 25 ± 2 °C. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres réplicas. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas recuperación genotipos y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de estrés, según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.10 Relación de la expresión de los genes CpHsf con la fuga de electrolitos en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en *Carica papaya* L.

En *Carica papaya* L. se desconoce la posible relación entre los niveles de expresión de los genes HSF con los daños fisiológicos en respuesta a estrés térmico, hídrico y un estrés combinado. Bajo estrés térmico (50 °C/2 h), en el genotipo silvestre se encontró una relación negativa de la expresión de genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 con fuga de electrolitos (i.e. a mayor expresión de los genes HSF menor fuga de electrolitos). Lo que sugiere que en el genotipo silvestre la expresión de estos genes de alguna manera está asociados a una mayor protección a la membrana ante un estrés térmico (Figura 4.11 B, D y F). Por el contrario, en el caso del cv. Maradol, el gen CpHsfA2 tuvo una correlación positiva ($R^2=0.79$; a mayor expresión mayor daño), mientras que se encontró una baja correlación entre los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d y CpHsfB3 y fuga de electrolitos. Sugiriendo que en este genotipo (susceptible), los cambios de expresión en dichos genes no resultan en un menor daño en membrana antes un estrés térmico, como lo ocurre en el genotipo Silvestre.

Durante el estrés hídrico, se presentó una relación negativa de la expresión de genes HSF y fuga de electrolitos durante el estrés hídrico, lo que sugiere que la expresión de 2 de los 3 genes tipo HSF (CpHsfA2 y CpHsfB3), si están correlacionados con algún tipo de protección a membrana en el genotipo Silvestre. Mientras que, los cambios en la expresión del gen CpHsfA1d, no parece conferir protección a membrana ante un estrés hídrico. Por otro lado, en el genotipo Maradol, la expresión de los genes HSF presentaron una relación positiva contra fuga de electrolitos (i.e. a mayor expresión, mayor daño en membrana). Lo que sugiere que genotipo susceptible, la baja expresión de genes HSF no está asociado a algún tipo de protección a la membrana ante un estrés hídrico (Figura 4.12 B, D y F).

En respuesta al estrés combinado, nuevamente, el genotipo silvestre presentó una correlación negativa ($R^2=-0.90$), entre los niveles de expresión de los 3 genes y fuga de electrolitos (i.e. a mayor expresión, menor daño en membrana), Figura 4.13. Por el contrario, el genotipo susceptible (Maradol) presentó correlaciones positivas de la

expresión de genes CpHsfA2 ($R^2= 0.89$) y CpHsfB3 ($R^2=0.85$), mientras que el gen CpHsfA1d presentó una baja relación negativa de $R^2=-0.15$ (a mayor expresión, mayor también el daño en membrana). Lo que sugiere que, en este genotipo susceptible, el bajo nivel de expresión de los genes HSF no confiere protección a membrana ante el estrés combinado hídrico más térmico.

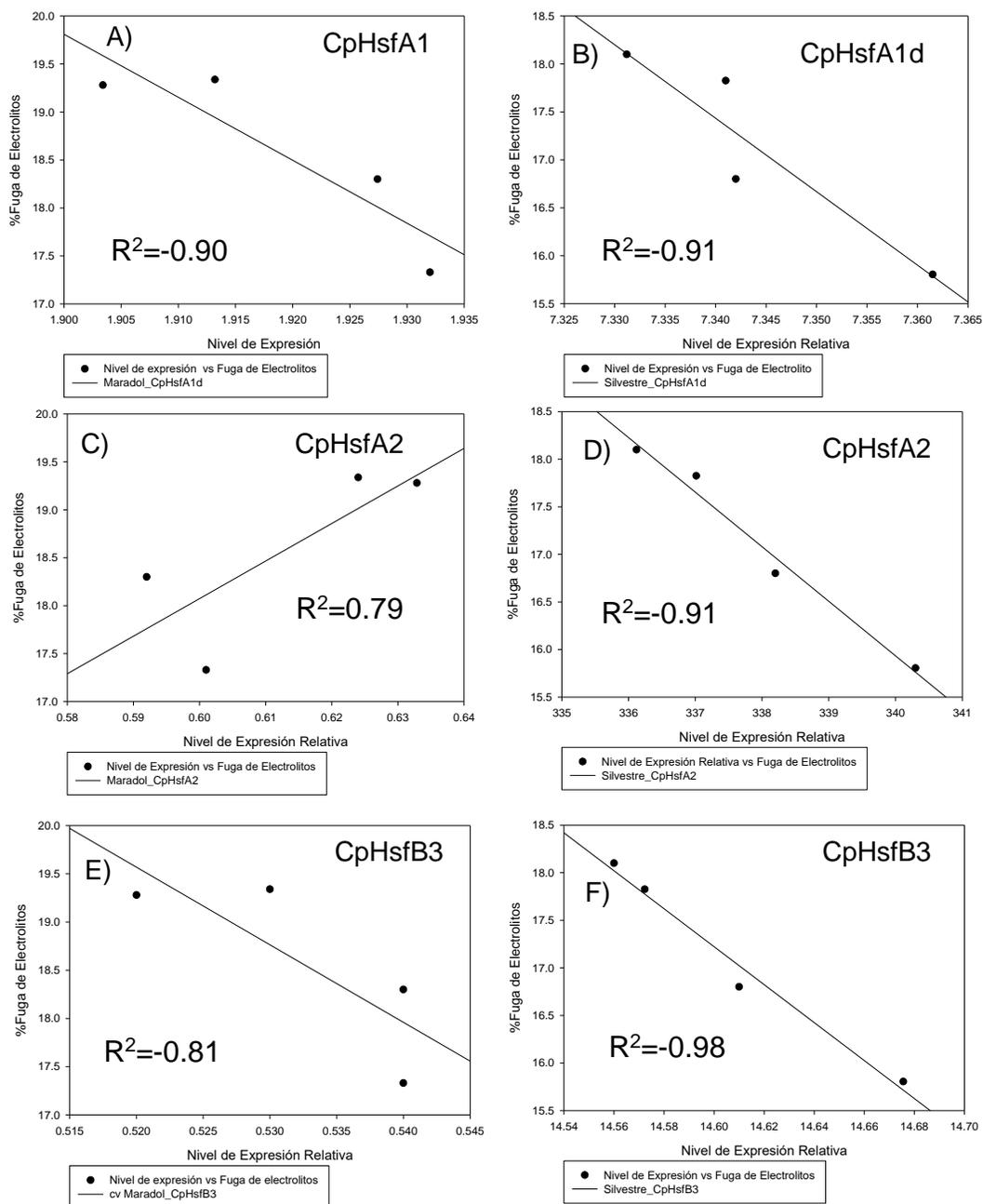


Figura 4.11 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y la fuga de electrolitos en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

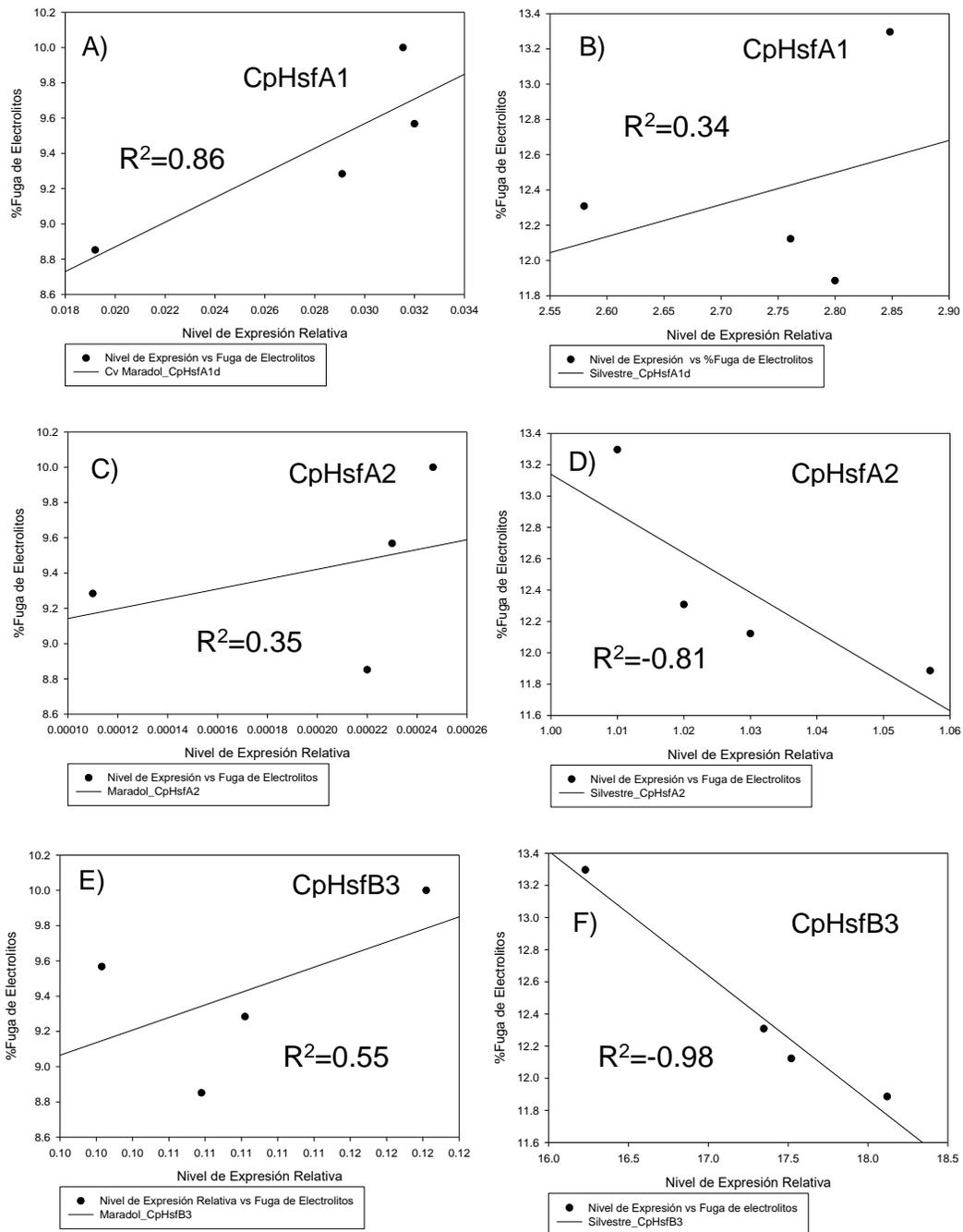


Figura 4.22 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y la fuga de electrolitos en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

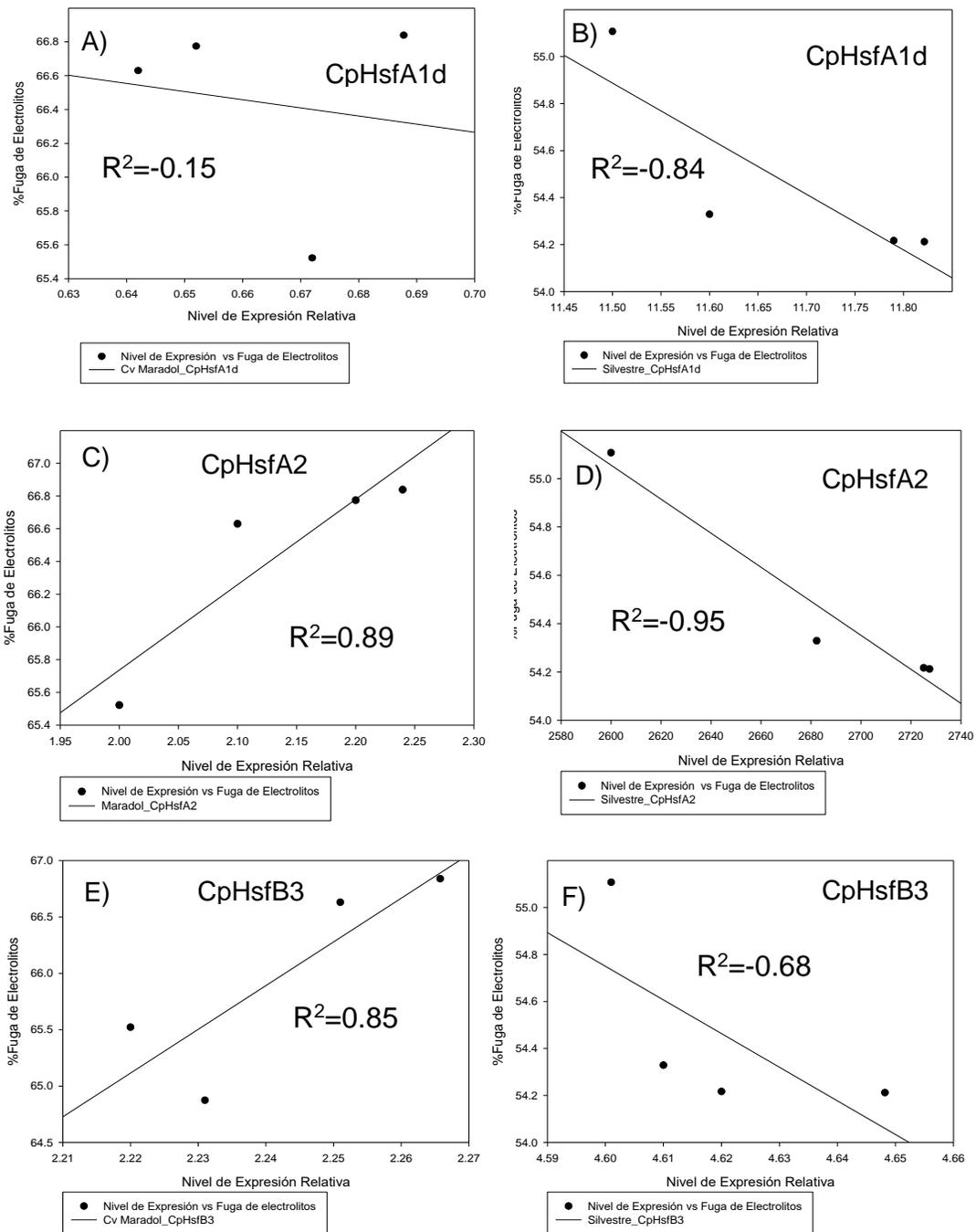


Figura 4.13 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y la fuga de electrolitos en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

4.4.11 Relación de la expresión de los genes CpHsf y la tasa fotosintética en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en *Carica papaya* L.

Resulta interesante conocer si los genes HSF podrían estar relacionados con la protección del aparato fotosintético en respuesta a estrés térmico, hídrico y estrés combinado en *Carica papaya* L.

Los análisis del coeficiente de correlación de Pearson indica que existe relación positiva y significativa ($R^2=0.90$, $R^2=0.93$ y $R^2=0.92$) entre la expresión de genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 y fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante el estrés térmico sugiere que en el genotipo tolerante (Silvestre) a mayor expresión de los 3 genes, mayor tasa fotosintética a pesar del estrés, sugiriendo que la expresión de estos genes de alguna manera está asociados a una mayor protección al proceso fotosintético. Por el contrario, en el caso del genotipo susceptible (Maradol), la expresión de 2 de 3 genes HSF tuvo una correlación positiva no significativa, indicando que a mayor expresión menor fotosíntesis durante el estrés térmico, solo el gen CpHsfB3 presentó una correlación negativa de $R^2=-0.78$.

Durante el estrés hídrico, nuevamente la relación positiva y altamente significativa de la expresión de genes HSF y fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), sugiere que nuevamente el genotipo Silvestre la expresión de 2 de 3 genes (CpHsfA1d y CpHsfB3) si están correlacionados con algún tipo de protección al proceso fotosintético ($R^2=0.90$ y $R^2=0.91$), solo la expresión de CpHsfA2 no parece conferir protección al proceso fotosintético ($R^2=-0.80$). Por el contrario, en el caso de Maradol, el aumento en la expresión de los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 da una relación negativa, el gen CpHsfB3 presenta correlación positiva pero no significativa ($R^2=0.51$), indicando que, a mayor expresión, mayor disminución en la tasa fotosintética. Lo que sugiere que este genotipo susceptible, la expresión de genes HSF no está asociado a algún tipo de protección al proceso fotosintético ante el estrés hídrico.

Durante el estrés combinado, el genotipo Silvestre (tolerante) presenta una correlación positiva y significativa ($R^2=0.89$ y $R^2=0.90$) en la expresión de CpHsfA1d y CpHsfA2 con fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), indicando que, a mayor expresión, menor disminución en la tasa fotosintética a pesar del estrés combinado. En cambio, en la expresión del gen

CpHsfB3 no parece estar asociado a alguna función protectora al proceso fotosintético en el genotipo Silvestre ($R^2=-0.44$).

Por el contrario, el genotipo susceptible (Maradol) presenta correlaciones negativas de la expresión en los tres genes HSF y fotosíntesis, indicando que, a mayor expresión, mayor también el daño al proceso fotosintético. Sugiriendo que, en este genotipo susceptible, el cambio en expresión de los genes HSF no confiere protección al aparato fotosintético durante el estrés combinado de déficit hídrico más choque térmico (Figura 4.16 A, C y E).

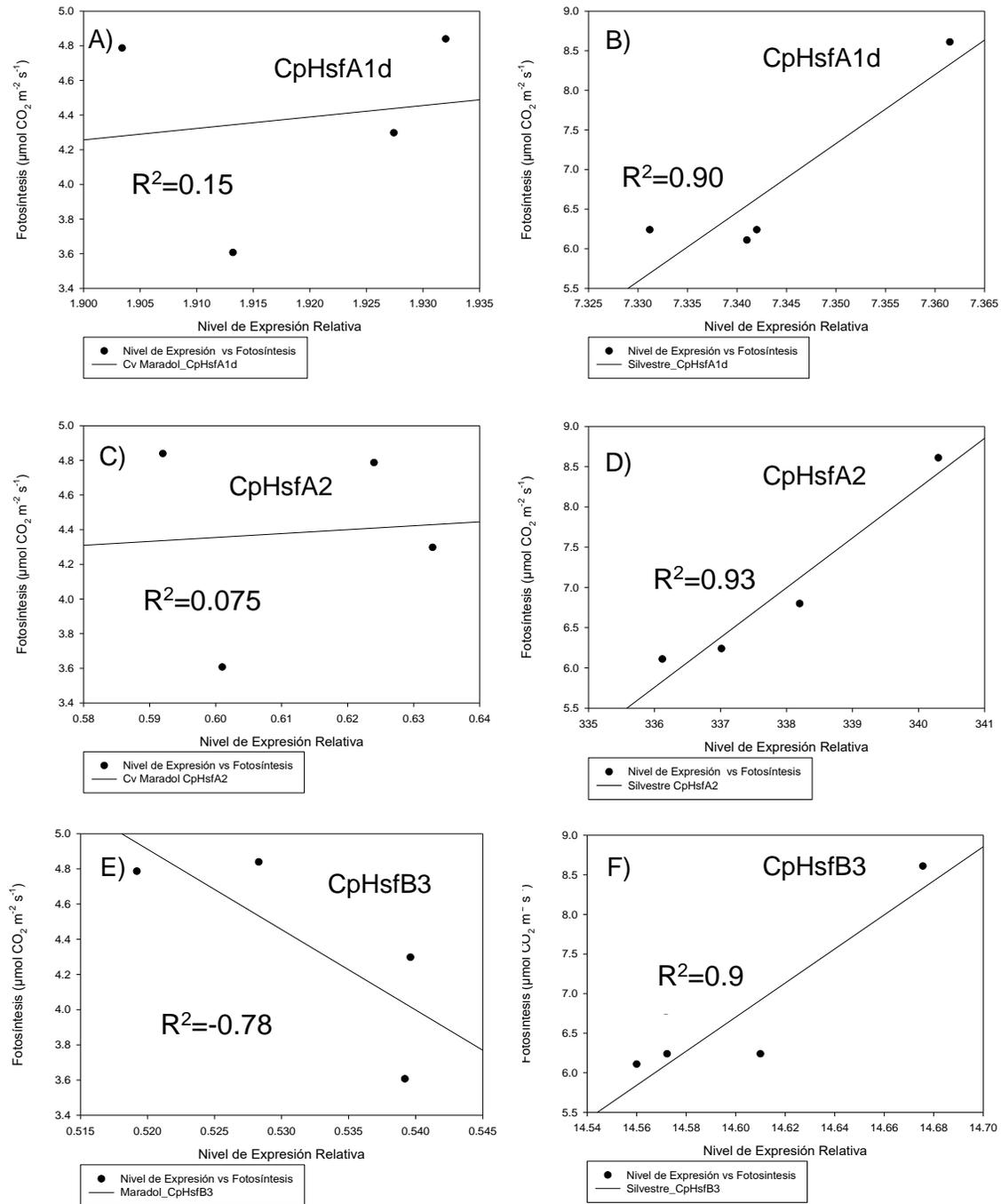


Figura 4.14 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y fotosíntesis en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

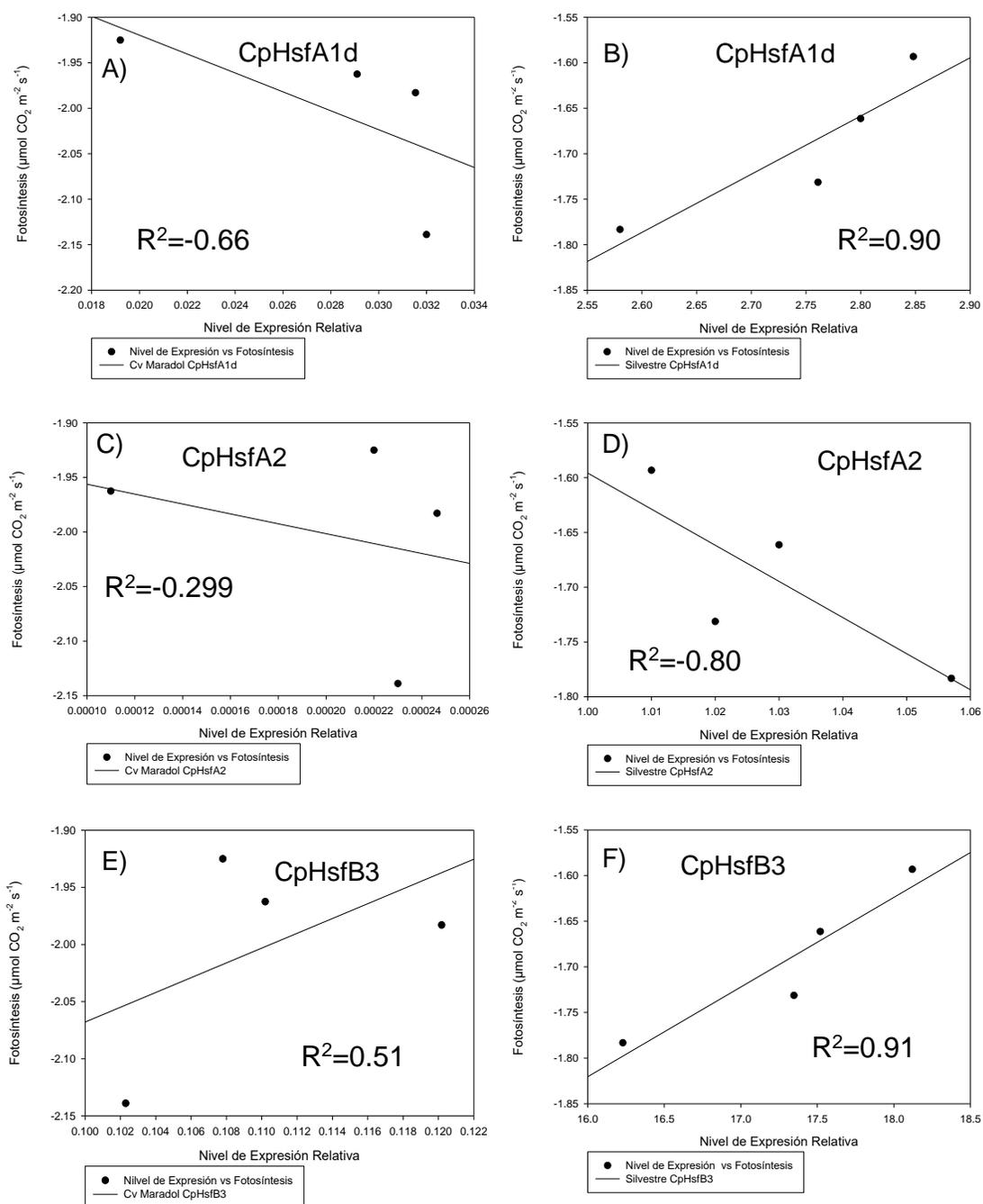


Figura 4.15 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y fotosíntesis en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

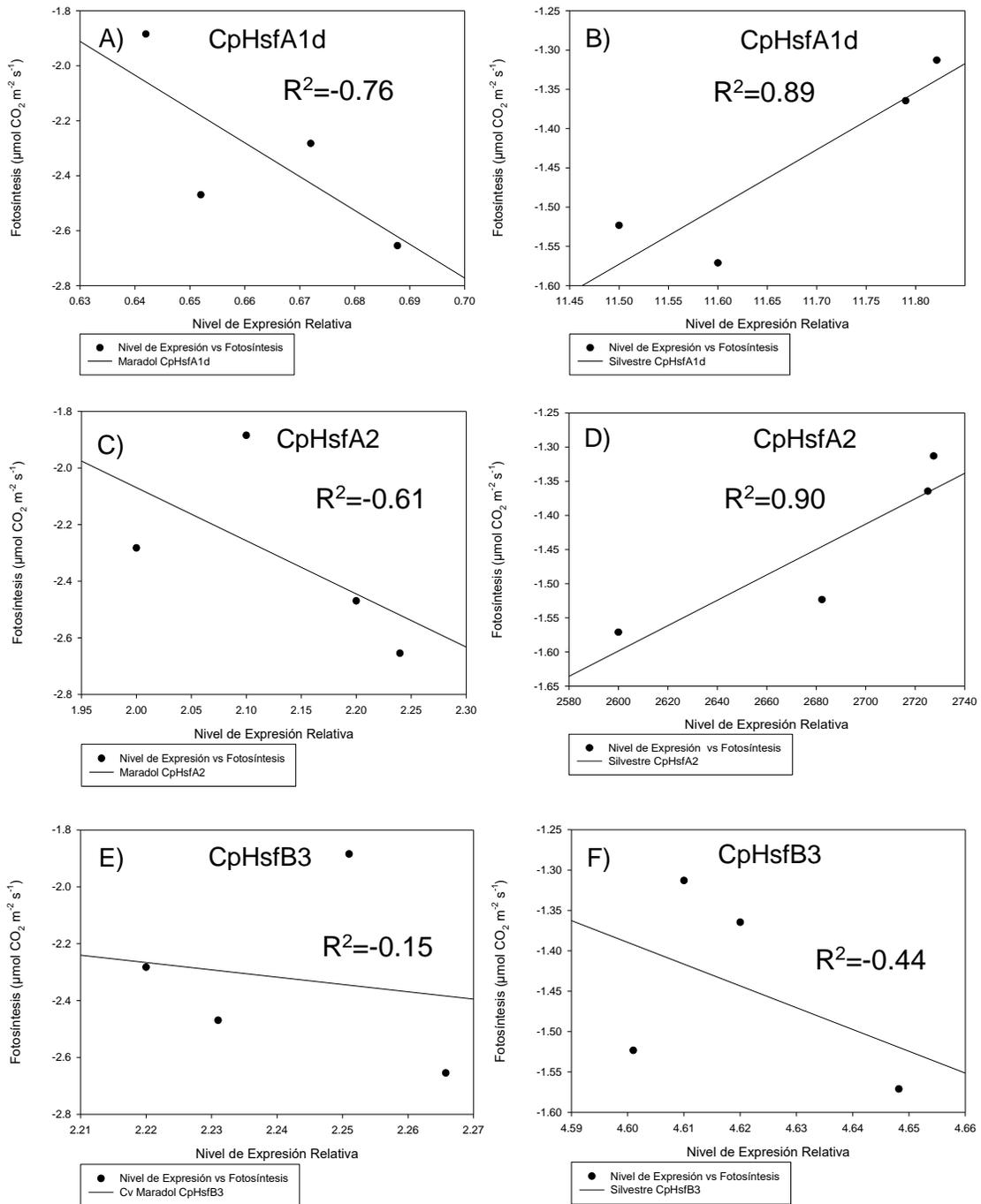


Figura 4.16 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y fotosíntesis en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

4.4.12 Relación de la expresión de los genes CpHsfs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en *Carica papaya* L.

La fotosíntesis incorpora numerosos componentes, que incluyen vías de reducción de CO₂, fotosistemas fotosintéticos y el sistema de transporte de electrones. En *Carica papaya* L. Silvestre la expresión de genes HSF mostro una correlación positiva con el índice de rendimiento (PI_{abs}): parámetro que considera la concentración de centros de reacción por clorofila, el transporte de electrones y la disipación del exceso de energía de excitación, logrando el rendimiento de la fotoquímica del fotosistema II.

Durante el estrés térmico, la relación positiva encontrada entre la expresión de genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.82$, $R^2=0.93$ y $R^2=0.42$) con PI_{abs} sugiere que en el genotipo tolerante (silvestre) a mayor expresión de los 3 genes, mayor eficiencia en la cadena de transporte electrónico a pesar del estrés, sugiriendo que la expresión de estos genes de alguna manera están asociados a una mayor protección al proceso fotosintético (Figura 4.17 B, D y F). Por el contrario, en el caso del cv. Maradol, la expresión de los 3 genes HSF tuvo una correlación negativa ($R^2=-0.13$, $R^2=-0.16$ y $R^2=-0.87$), indicando que a mayor expresión menor eficiencia del transporte de electrones en la fase luminosa de fotosíntesis durante el estrés térmico, indicando que en el cv. Maradol la expresión de los genes HSF no protege al aparato fotosintético del estrés térmico (Figura 4.17 A, C y E).

En respuesta a estrés hídrico, del mismo modo encontramos relación positiva y altamente significativa ($R^2=0.90$, $R^2=0.52$ y $R^2=0.93$) de la expresión de genes HSF y PI_{abs} durante el estrés hídrico, sugiere que nuevamente en el genotipo Silvestre la expresión de los 3 genes (CpHSFA1d, CpHSFA2 y CpHSFB3) si están correlacionados con algún tipo de protección al aparato fotosintético durante la fase luminosa cuando se exponen las plantas a estrés hídrico (Figura 4.18 B, D y F). En forma interesante, en el caso de Maradol, se encontró una correlación positiva entre el aumento en la expresión de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.66$ y $R^2=0.63$) con el PI_{abs}, indicando que, a mayor expresión, menor disminución en la eficiencia de transporte electrónico en la fase luminosa como resultado de estrés hídrico (Figura 4.18 C y E). Lo que sugiere que, en este genotipo susceptible, la expresión de estos genes si están asociados a algún tipo de protección al aparato fotosintético, aunque en menor medida que en el genotipo tolerante (a juzgar por los

menores coeficientes de correlación). Por el contrario, el gen CpHsfA1d no parece estar involucrado en alguna forma de protección al aparato fotosintético en el cv. Maradol, en presencia de estrés hídrico. (Figura 4.17 A).

De igual forma, durante el estrés combinado el genotipo silvestre (tolerante) presenta una correlación positiva y altamente significativa ($R^2=0.93$ y $R^2=0.94$) de la expresión de 2 de los 3 genes HSF (CpHsfA1d y CpHsfA2) y PI_{abs} , indicando que, a mayor expresión, menor disminución en la eficiencia de transporte electrónico causado por del estrés combinado (Figura 4.19 B y D). Por el contrario, el genotipo susceptible (Maradol) presenta correlaciones negativas en CpHsfA1d y CpHsfB3 (Figura 4.19 A y E). Sin embargo, si presenta correlación positiva (aunque baja) entre la expresión del CpHsfA2 con PI_{abs} . Indicando que solo en este gen, a mayor expresión menor daño en el aparato fotosintético. En el caso de los otros 2 genes no parece haber relación entre expresión y protección al fotosistema cuando las plantas se exponen al estrés combinado por déficit hídrico más choque térmico.

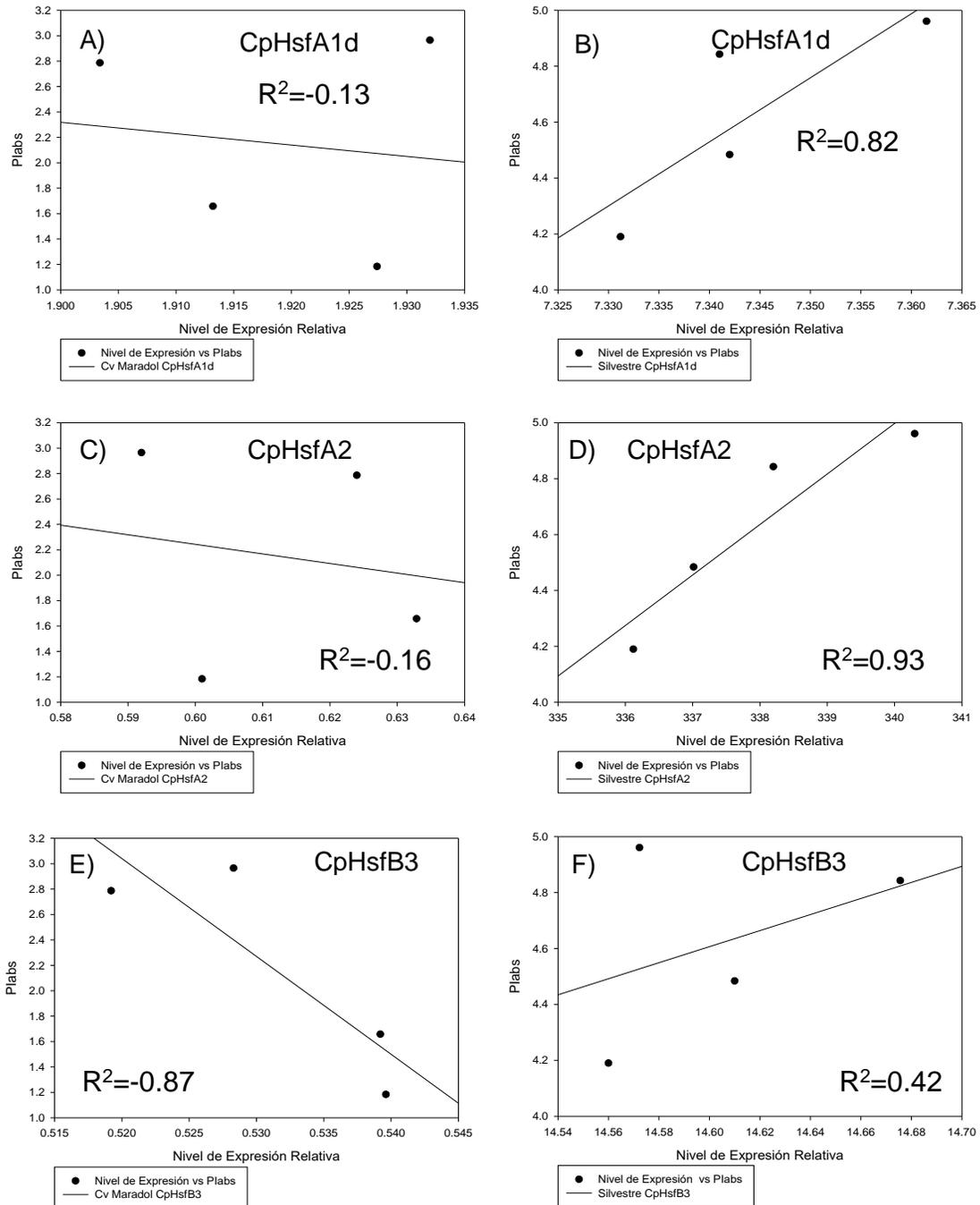


Figura 4.17 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por choque térmico (50 °C/2 h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre

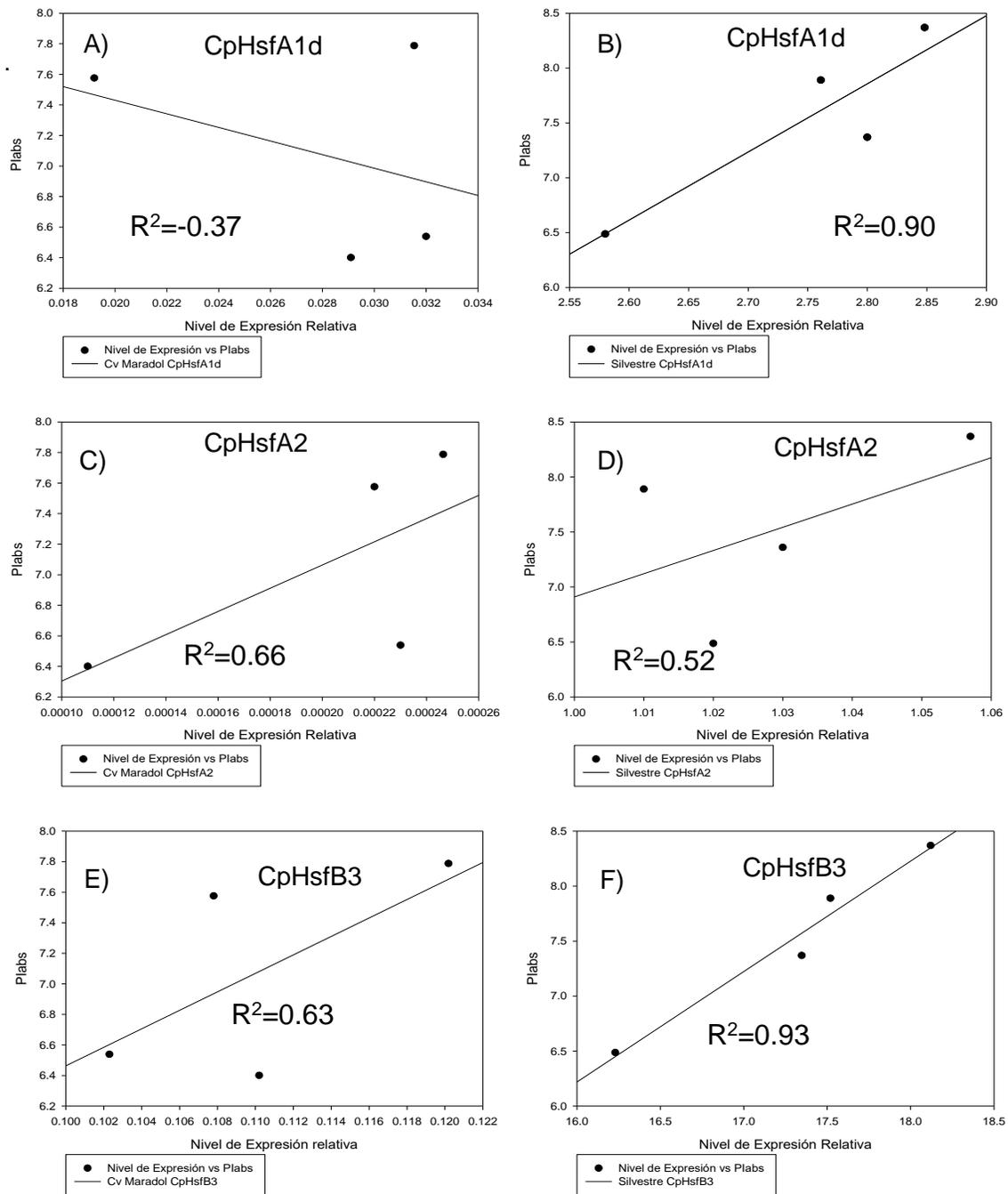


Figura 4.18 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

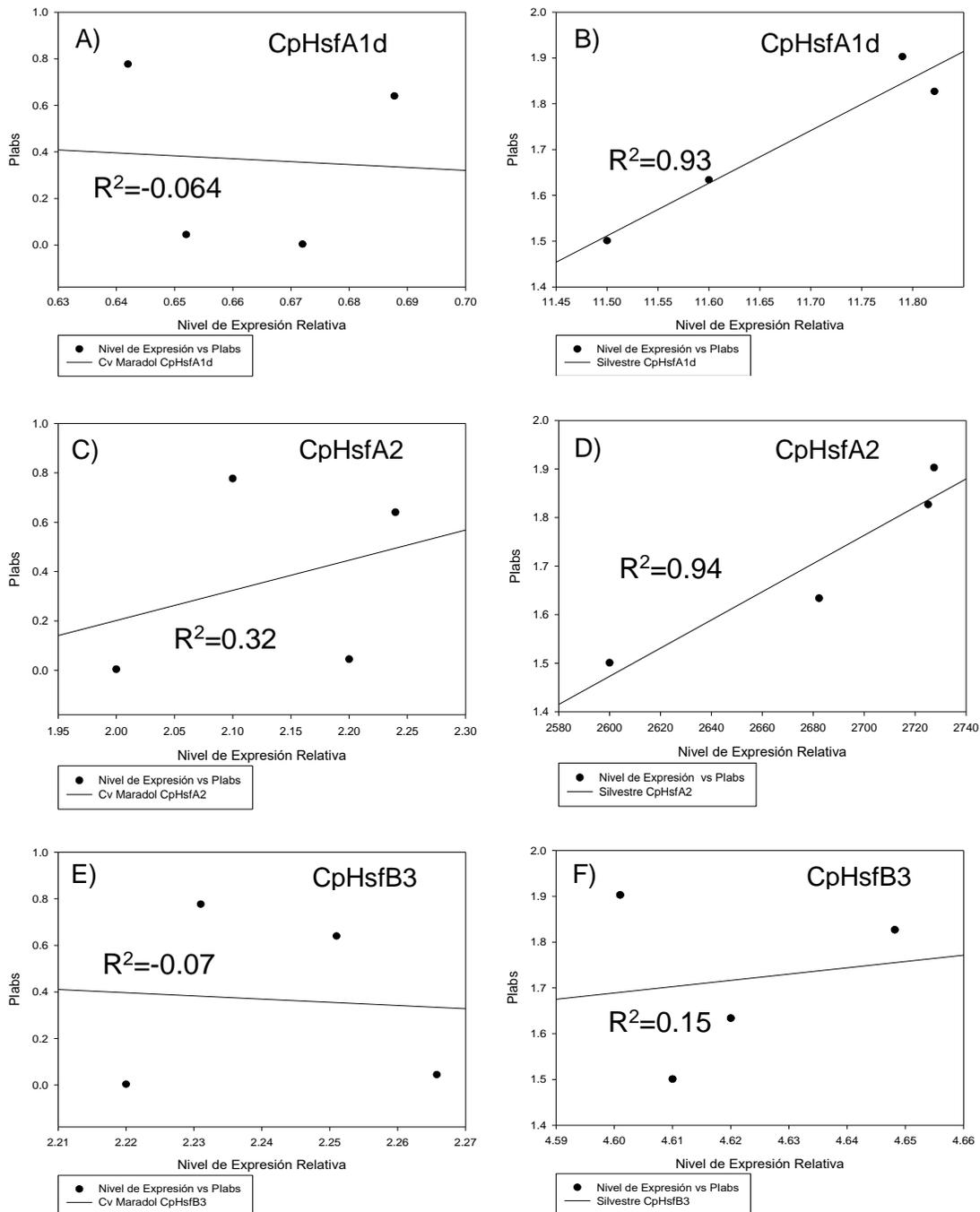


Figura 4.19 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs y el índice de rendimiento cuántico del PSII en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 en plantas Maradol y Silvestre.

4.4.13 Relación entre los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado en *Carica papaya* L.

Retomando los análisis de expresión de los genes HSF, recordemos que, el gen CpHsfA2 fue el dominante a altas temperaturas con un valor REL de 336 en respuesta a estrés térmico, el gen CpHsfA1d con 7.36 y CpHsfB3 con una expresión relativa de 14.58 en el genotipo Silvestre. Mientras que en el cultivar Maradol la expresión fue significativamente menor con valores <1.92 en los tres genes. En este sentido para lograr la comprensión de la relación de dichos genes en la vía de respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado del mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre, se realizó una correlación entre los niveles de expresión de los tres genes evaluados en este capítulo con el índice de Pearson.

La relación entre niveles de expresión se muestra en la figura 4.19, se señala que los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en el genotipo Silvestre fue positiva y estadísticamente significativa entre los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.83$), CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.89$) y CpHsfA2 y CpHsfA1d ($R^2=0.65$). Por otro lado, el genotipo susceptible (Maradol), presentó correlación positiva entre los niveles de expresión de los mismos genes, pero no significativa, CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.45$) y CpHsfA2 y CpHsfA1d ($R^2=0.14$). Interesante que durante el estrés la expresión entre los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 no esté relacionada en el cv. Maradol ($R^2=-0.81$).

Durante el estrés hídrico, se encontró que el gen CpHsfB3 presentó mayor nivel de expresión en el genotipo Silvestre (17.34), posteriormente el gen CpHsfA1d (2.84) y finalmente el gen CpHsfA2 (1.05). Por otro lado, los valores de expresión en el cv. Maradol fueron significativamente menores <0.12 . Mediante análisis de correlación encontramos que los tres genes HSF están altamente correlacionados solo en el genotipo Silvestre, CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.86$), CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.98$) y CpHsfA2 y CpHsfA1d ($R^2=0.78$). Mientras que en el genotipo susceptible la correlación no es significativa entre niveles de expresión de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 con valores de $R^2=0.12$, CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.18$) y CpHsfA2 y CpHsfA1d ($R^2=0.008$). Es interesante que en el genotipo Silvestre la relación entre el gen CpHsfA1d (activador) y CpHsfB3 (represor) sea altamente significativa ($R^2=0.98$).

En respuesta a estrés combinado, similar a lo ocurrido en estrés térmico el gen CpHsfA2 fue el dominante con un valor significativamente mayor de 2,727 en respuesta a estrés térmico, el gen CpHsfA1d con 11.82 y CpHsfB3 con una expresión relativa de 4.64 en el genotipo Silvestre. Mientras que en el cultivar Maradol la expresión fue significativamente menor con valores <2.23 en los tres genes.

La relación de los niveles de expresión en estrés combinado, los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 están significativamente correlacionados en el genotipo Silvestre ($R^2=94$). Sin embargo, no se encontró relación entre los niveles de expresión entre CpHsfA1d y CpHsfB3 en los dos genotipos Maradol y Silvestre ($R^2=0.25$ y $R^2=0.28$). A diferencia en la relación de expresión de genes de los tratamientos de estrés térmico e hídrico, el cv. Maradol presentó correlación positiva entre los genes CpHsfA2 y CpHsfB3, sin embargo, a juzgar por su bajo nivel de relación de $R^2=0.67$ (Figura 4.22 A)

Parece ser que de acuerdo con el tipo de estrés la relación de la expresión de los genes HSF es diferente. Contrario a lo observado en el estrés térmico e hídrico donde se encontró mayor relación entre los genes (estrés térmico: CpHsfA2 y CpHsfB3) y (estrés hídrico: CpHsfA1d y CpHsfB3), en el estrés combinado presentó correlación significativa entre la expresión de los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 ($R^2=0.94$) en el genotipo tolerante (Silvestre). Sin embargo, estos genes también están altamente correlacionados en respuesta a estrés térmico e hídrico en *Carica papaya* L, es decir, su relación es independiente del tipo de estrés.

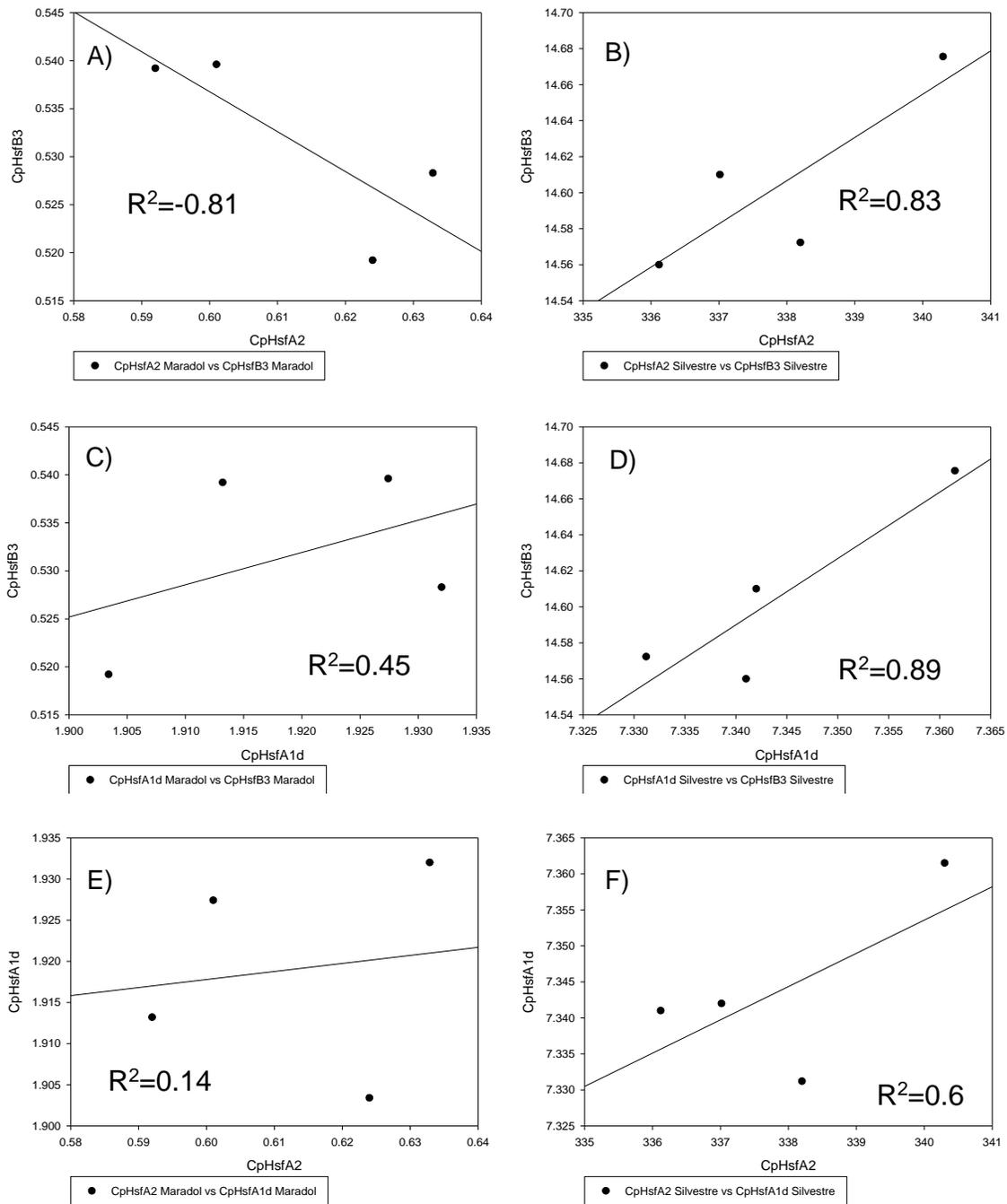


Figura 4.20 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés térmico (50 °C/2 h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 y CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 y CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d y CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre.

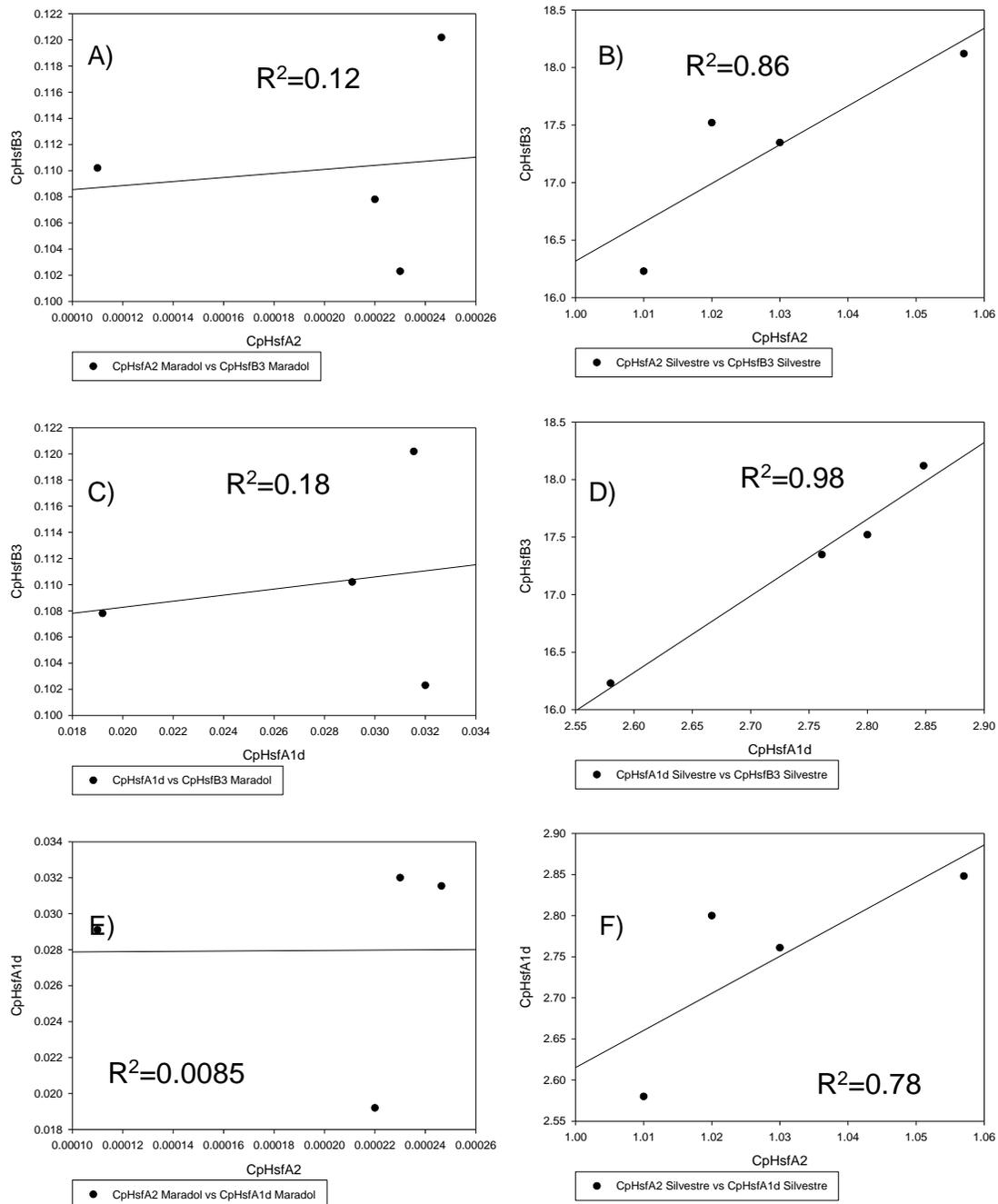


Figura 4.21 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs en dos genotipos de *Carica papaya* L cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés por déficit hídrico (14 días sin riego). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 y CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 y CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d y CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre.

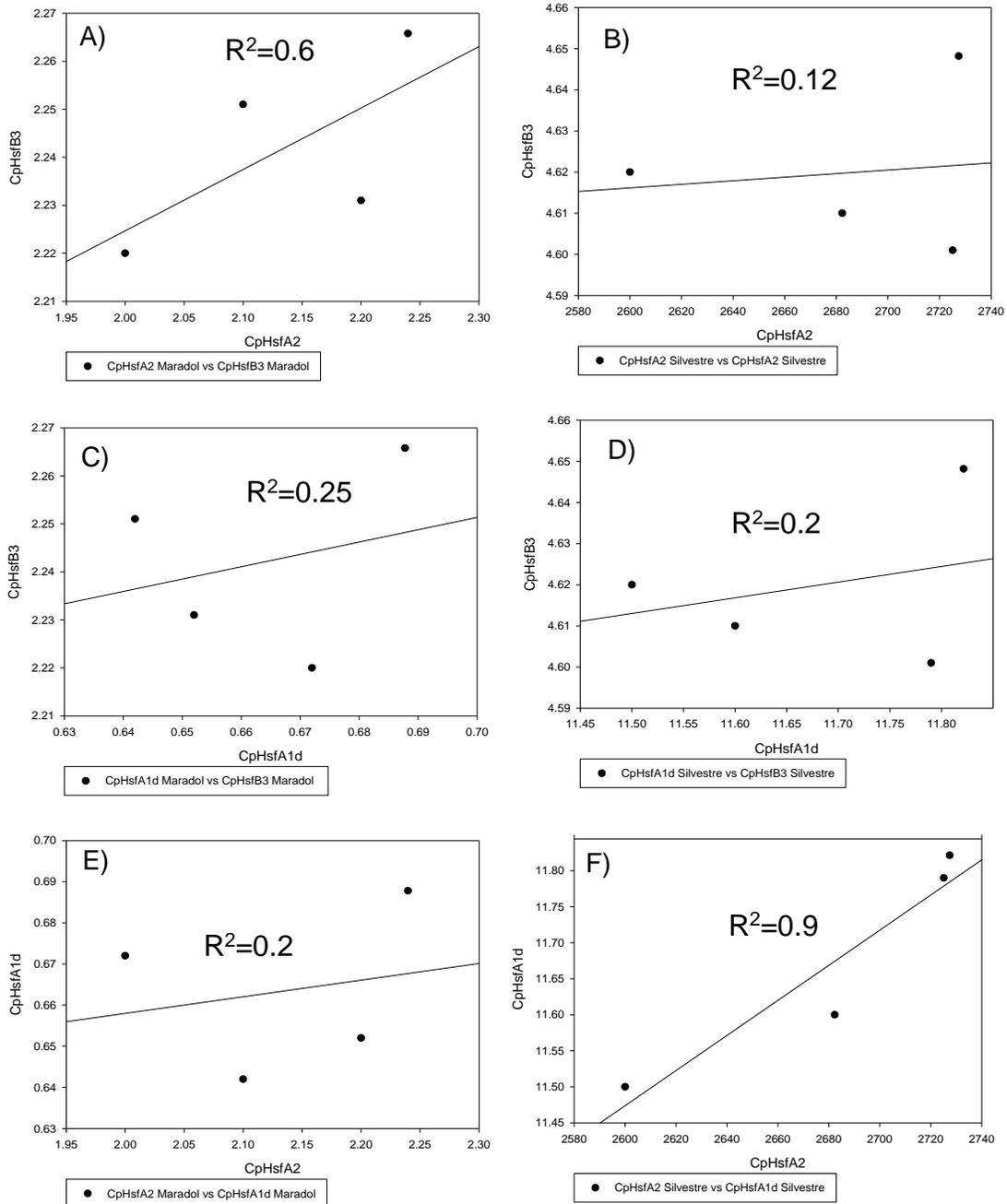


Figura 4.22 Relación entre el nivel de expresión de los genes HSFs en dos genotipos de *Carica papaya* L cv. Maradol y Silvestre en respuesta a estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h). A, B) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 y CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre, C, D) Nivel de Expresión del gen CpHsfB3 y CpHsfA1d en plantas Maradol y Silvestre, E, F) Nivel de Expresión del gen CpHsfA1d y CpHsfA2 en plantas Maradol y Silvestre.

4.5 DISCUSIÓN

4.5.1 Efectos sobre la morfología de *Carica papaya* L. en respuesta a estrés hídrico y térmico

Aunque las papayas se consideren plantas amantes del sol, también pueden adaptarse a otras condiciones ambientales, esto se debe a la plasticidad morfológica que implica cambios en muchas características de la planta, como la orientación foliar (paraheliotropismo), la densidad estomática, la relación de clorofila a/b, la longitud del entrenudo y la longitud de la raíz. Esta plasticidad es evidente por la morfología que adaptan las papayas al crecer en condiciones de estrés térmico e hídrico, como lo menciona Jiménez *et al.* (2013). Para lograr un crecimiento adecuado en papaya se requiere temperatura óptima entre 21-33 °C, probablemente las diferentes variedades y genotipos de papaya tienen rangos de temperatura óptimo diversos, cualquier variación puede influir en casi todas las etapas de crecimiento de la planta, desde la emergencia hasta la maduración del fruto (Chaves y Gutiérrez, 2017). En un estudio de clona "Honey Gold" de papaya (*Carica papaya* L.) sometidos a altas temperaturas (36/28 °C) durante dieciocho meses, el estrés por calor causó una aceleración del crecimiento, y se tradujo en plantas altas y débiles, con frutos más pequeños, elongados y de maduración temprana; las plantas también presentaron menores reservas de carbohidratos y poca viabilidad del polen (Allan *et al.*, 1987). En otro análisis realizado por Jumiatur *et al.* (2016), encontraron que bajo sus tres tratamientos de estrés térmico (28.3, 32.1 y 33.1 °C), no afectó el crecimiento de la altura en las variedades de la planta *Oryza sativa* L. A una temperatura mayor (40 °C) la papa presentó hojas más pequeñas, proporciones más altas de materia seca de tallo a hoja (Khedher y Ewing, 1985). En caña de azúcar, las altas temperaturas causaron un decaimiento en la acumulación de biomasa, la tasa de crecimiento y entrenudos más cortos (Wahid, 2007). En otro estudio, en las etapas de crecimiento de *Oryza sativa* L. a 41 °C, la altura de la planta se ve afectada por estrés térmico (Kumar *et al.*, 2018). Observamos que los efectos del estrés térmico son variados y muy pronunciados en las especies mencionadas, en nuestro caso, las plantas de *Carica papaya* L. no presentaron reducción en el crecimiento, abscisión de hojas como lo describen algunos autores y esto puede deberse a la duración de la exposición, la intensidad de estrés, la edad de la planta, la diferencia de variedades y genotipos. Respecto al tratamiento de estrés por déficit hídrico se considera de los más devastadores en los cultivos, confirmado en *Carica*

papaya L. cv. Maradol y Silvestre. En la Figura 4.1, se observa el efecto por déficit hídrico (14 días sin riego) en la pérdida de clorofila, reducción de turgencia, disminución de crecimiento, abscisión de hojas y adelgazamiento de tallo. Tanto en el tratamiento de estrés hídrico y la combinación de ellos (14 días sin riego más 50 °C durante dos horas), los cambios morfológicos fueron mayores que al estrés por alta temperatura; abscisión foliar, disminución de clorofila, enrollamiento de hoja, pérdida de turgencia, disminución de crecimiento, adelgazamiento del tallo en el genotipo Maradol, mientras que el efecto fue menos notorio en el genotipo silvestre. Estas reducciones o alteraciones morfológicas se pueden deber a la alteración de la división y elongación celular debido a la pérdida de turgencia, o posiblemente a la administración de energía (fotosintátos) requeridos en diversos mecanismos de sobrevivencia como en el sistema de enraizamiento profundo y en su alta producción de biomasa, como lo informado por Girón (2015), que fue característico del genotipo Silvestre que presentó mayor longitud de raíz y mayor biomasa que Maradol, en los diferentes tiempos de estrés a los que fueron expuestos los materiales de papaya (7, 14 y 21 días). Entre los cultivos, el arroz y malanga como cultivo sumergido es más susceptible al estrés por sequía, de igual modo el cultivo de *Carica papaya* es altamente susceptible debido a la alta cantidad de agua que requiere, por ejemplo, para el amarre del fruto. En plántulas de cítricos, la altura de la planta se redujo hasta 25% con escasez de agua (Wu *et al.*, 2008). Como en el cultivar de papaya Baixinho de Santa Amalia después de 14, 20 y 34 días sin riego, disminuyó significativamente en la altura y el diámetro de la planta; después de integrar el riego a los 41 y 48 días se observó una recuperación, pero, no al nivel control (Mahouachi *et al.*, 2006). Por último, se observó mayor afectación en la respuesta morfológica en el tratamiento de estrés combinado en los dos genotipos de papaya, el efecto fue mayor en papaya cv. Maradol que en el genotipo Silvestre. Como lo ocurrido en trigo, la combinación de sequía más calor afectó significativamente el contenido de clorofila de la hoja, el número de granos y el índice de cosecha que los efectos del estrés individual (Prasad *et al.*, 2011). Y en la evaluación de dos genotipos de cebada (Arta y Keel) bajo tratamiento de estrés combinado (15% contenido de agua del suelo más 36 °C durante 4 h), causó reducciones significativas en la biomasa y rendimiento de grano que en los tratamientos individuales de estrés y entre genotipos fue menor en cebada Keel (Rollins *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Alcocer (2013), en *Carica papaya* L. cv. Maradol, observó que la reducción de biomasa surgió después de una semana del estrés térmico de 50 °C durante 4 h, y después de 10

días de recuperación las hojas jóvenes se mantuvieron adheridas a la planta y surgieron nuevos brotes.

Es enriquecedor estudiar y caracterizar el efecto del estrés térmico, hídrico y la combinación de ellos, en este genotipo Silvestre por lo que ahora tenemos elementos morfológicos, fisiológicos y moleculares para identificar rasgos relacionados con la tolerancia a calor y sequía, para así aportar mecanismos que puedan apoyar en conclusiones consistentes con poblaciones silvestres, ubicadas en el estado de Yucatán ya que las poblaciones Silvestres a menudo revelan una gran diversidad morfológica, relacionada con la plasticidad fenotípica.

4.5.2 El potencial hídrico de las hojas de papaya Silvestre es menor que el de las plantas del cv. Maradol en condiciones de estrés hídrico y térmico

El tiempo que no se aplicó el riego indujo un cambio en el estado hídrico de las plantas, es decir, la falta de riego de 14 días, si es una condición de estrés para la planta de papaya, debido a que el contenido de agua sí se vio afectado en forma negativa, es decir disminuyó, con lo cual entonces se caracterizaron las respuestas fisiológicas y moleculares en las plantas de papaya cv. Maradol y Silvestre. Una de las respuestas fisiológicas de las plantas a estrés térmico, sequía y la combinación de estos fue la disminución del potencial hídrico y del contenido relativo de agua (CRA). La exposición de las plantas a temperaturas muy altas (>50 °C) resulta en una reducción en el potencial hídrico y contenido de agua, principalmente debido a una mayor tasa de transpiración influenciada por el aumento de la temperatura de la hoja. Por otro lado, en condiciones de estrés hídrico y estrés combinado, el valor del potencial hídrico se hace más negativo y esto se debe a la reducción de la tasa de transpiración. Documentamos que, en nuestros resultados, el tratamiento control mostró valores de: -0.79 MPa para el genotipo Maradol y -0.76 MPa para el genotipo Silvestre. Esto quiere decir, que valores negativos más próximos a cero son células más hidratadas.

En respuesta a estrés térmico (50 °C durante dos horas), el potencial hídrico de las plantas comerciales se mantuvo en -0.79 MPa, en cambio, el potencial hídrico del genotipo Silvestre, fue menor (-1.51 MPa, células menos turgentes). Además, este cambio se revirtió en gran medida cuando las plantas con estrés fueron colocadas a 25±2 °C y

regadas (Maradol, -0.85 MPa y Silvestre -1.0 MPa). Debido a que se promovió la disminución del potencial hídrico en las plantas Silvestres suponemos que las paredes celulares de estas plantas son más elásticas que Maradol, como lo explica Sánchez y Aguirreolea, (2008), cuanto mayor sea el valor de elasticidad mayor resistencia a la deformación de la pared celular, para células vegetales los valores de elasticidad se encuentran entre 1 a 50 MPa, valores superiores indican tejidos con células relativamente inelásticas o pequeñas. Sin embargo, es interesante, que el potencial hídrico de papaya silvestre sea menor que la del cv. Maradol, pero su CRA sea igual para ambos, de 86%, esto hace pensar que tal vez el genotipo silvestre usa el agua de manera eficiente, que se puede atribuir a las diferencias fenotípicas y requerimientos de agua: en caso de las plantas silvestres, son plantas más altas, producen mayor número de hojas, de mayor tamaño y pueden llegar a crecer en condiciones sin riego, mientras que el cv. Maradol requiere riego continuo.

La exposición a los diferentes tipos de estrés indujo una disminución significativa en el potencial hídrico de las hojas en respuesta a altas temperaturas, con una notoria disminución en plantas de papaya expuestas a sequía y estrés combinado hídrico/térmico ($p < 0.05$), y con diferencias significativas entre los genotipos Maradol y Silvestre. Datos que son respaldados por Alhaithloul (2019), donde el impacto del estrés combinado de estrés termico y estrés hídrico sobre el contenido relativo de agua (CRA) y el potencial hídrico foliar de los cultivos es mayor a diferencia del estrés individual en plantas de *A. sieberi-alba*. Ahmed *et al.* (2013), en su estudio compararon dos genotipos silvestres de cebada (XZ16 y XZ5) y un cultivar (CM72) donde el potencial hídrico y el potencial osmótico, tuvo un efecto negativo mayor en la combinación de estrés hídrico y salino, el CRA fue mayor en los genotipos silvestres que en el cultivado, y el potencial hídrico fue menor en el cultivado que en los silvestres, pero sin diferencias estadísticas (-1.5 MPa). De igual manera, nuestros resultados de potencial hídrico reflejan que el estrés hídrico (-2.19 ± 0.9 MPa) y combinado son estadísticamente muy similares (-2.76 ± 0.29 MPa), con diferencias estadísticas entre los genotipos Silvestre y Maradol, pero con efectos más negativos en el CRA y el potencial hídrico del tratamiento de estrés combinado. En gran medida, la reducción del potencial hídrico (Ψ_H) de -2.95 MPa en el cv. Maradol y en el genotipo Silvestre de -2.69 MPa en estrés combinado (déficit hídrico más choque térmico), es tan bajo que podría afectar negativamente las reacciones bioquímicas y a la mayoría

de los procesos fisiológicos, como lo indican Xu y Sheng (2006), el estrés combinado del estrés hídrico y alta temperatura causó un efecto más drástico en la disminución del potencial hídrico (-2.8 MPa), acompañada de cambios en el metabolismo del nitrógeno, una mayor peroxidación de lípidos y mayor pérdida de la función del PSII que el estrés individual en plantas de *Leymus chinensis*.

El CRA disminuyó drásticamente en el estrés combinado, de 85% en estrés térmico, 83% estrés hídrico a 55% CRA en el cv Maradol y en el genotipo Silvestre con 67% bajo estrés hídrico más choque térmico, esta diferencia entre el aumento en el potencial hídrico en estrés por déficit hídrico y estrés por alta temperatura que no se ve tan afectado en el CRA bajo estrés combinado. Esto sugiere que el genotipo Silvestre mantiene potenciales hídricos menores, pero puede mantener el CRA más alto que Maradol, probablemente esto se debe a que, bajo estrés térmico e hídrico, las plantas de papaya sean capaces de acumular más actividad de solutos compatibles (l.e. prolina), en comparación al estrés combinado, como lo ocurrido en *Amaranthus tricolor*, bajo estrés hídrico los cultivares V14 y V16 con mayor CRA presentaron mayor cantidad de prolina, antioxidantes no enzimáticos como caratenoides, ácido ascórbico en contraparte el cultivar con menor CRA presentó menor cantidad de soluto y antioxidantes (Sarker y Oba, 2018). Esto como posible estrategia para mantener el CRA.

4.5.3 Efectos de altas temperaturas y estrés hídrico en plantas de papaya sobre el fotosistema II

En las láminas tilacoides, en donde se lleva a cabo la oxidación del agua, la reducción de NADP y la formación de ATP, son los sitios principales de lesión por las altas temperaturas (Mathur *et al.*, 2014). Por lo tanto, la estabilidad del aparato fotosintético II y, la velocidad del transporte de electrones se ha analizado con frecuencia a través de mediciones de fluorescencia de clorofila. El uso de la relación F_v/F_m se basa en la suposición de que F_0 se mide en centros de reacción abiertos (Q_A completamente oxidado) y F_m en centros de reacción cerrados (Q_A completamente reducido). Dicho parámetro, se ha analizado en un gran número de especies manteniendo un valor cercano a 0.832, si el PS II está íntegro y, por lo tanto, si la eficiencia de la energía de excitación en el proceso fotoquímico es adecuada versus si las plantas han sufrido un grado de daño en este proceso entonces los valores serán menores (Maseyk *et al.*, 2019).

En nuestros resultados, el valor medio de F_v/F_m en las plantas control fue de 0.83 ± 0.003 , valor que está dentro de lo establecido en las hojas de las plantas con metabolismo C_3 sin estrés, mientras que la relación F_v/F_m se redujo en 2% en el genotipo Maradol, respecto al genotipo Silvestre en estrés por alta temperatura, que se mantuvo en valores de 0.8, y que después de un tiempo de recuperación volvió a los valores control. Es importante destacar, que la disminución en el genotipo Maradol podría tener varias causas: alteraciones estructurales en el supercomplejo de PSII que dificulta la transferencia de energía del complejo antena al centro de reacción, fotoinactivación de los centros de reacción lo que conlleva a un aumento de F_0 , enfriamiento no fotoquímico o mecanismos reguladores fotoprotectores e inhibición de la cadena fotosintética de transporte de electrones. Aun con el tiempo de exposición a altas temperaturas de 2 h, causó estrés térmico moderado con una inactivación reversible del PSII. Algo similar, ocurrió en el estudio de Camejo *et al.* (2006) en *Lycopersicon esculentum* var Amalia y el genotipo Nacarlang de tipo silvestre, donde se vio reducida F_v/F_m , en la variedad considerada susceptible de 0.81 a 0.70 después del estrés térmico (45 °C por 20 min), mientras que la variedad tolerante se mantuvo en valores de F_v/F_m de 0.81 a 0.81, es decir no mostró afectación por altas temperaturas. Otro estudio, por Zhou *et al.* (2015), en tomate, aplicaron 3 pruebas a 67 genotipos para conocer la tolerancia a calor bajo el parámetro de fluorescencia, encontrando en la primera prueba (36/28 °C durante 14/10 h), el

promedio de los 67 genotipos de tomate que disminuyó en un 2.0% el valor de Fv/Fm, en una segunda prueba (40 °C durante 7 h) se redujo Fv/Fm 3.9% en comparación con el control. Sharma *et al.* (2015), evaluaron 41 cultivares de *Triticum aestivum* L. bajo 40 °C durante 3 días, encontrando más reducción de Fv/Fm en algunos cultivares, en general el 2.4% menor que del control. Wu *et al.* (2001), después de un tratamiento de estrés térmico a 45 y 50 °C en *Capsicum frutescens* y un tratamiento de recuperación durante 24 h a 25 °C, la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) disminuyó y al momento de incorporar a recuperación, Fv/Fm se restauró casi por completo.

No obstante, este parámetro es menos sensible al estrés por déficit hídrico y no puede revelar con precisión las alteraciones del PSII, por ello, integramos el análisis de los cambios en el índice de rendimiento de PSII en función de la absorción (PI_{abs}), parámetro indicativo de vitalidad de la planta, por dar información de la densidad del centro de reacción, la eficiencia de captura y la eficiencia del transporte de electrones, En consecuencia, si el estrés afecta a alguno de estos componentes, el efecto se mostrará en el índice de rendimiento PI_{abs} , que por lo tanto tiene una sensibilidad mayor que la lograda por cualquiera de sus componentes aislados (Stirbet y Govindjee., 2011). En efecto, el valor de PI_{abs} inicial fue de 8 y 7, en Maradol y Silvestre, respectivamente. En respuesta a estrés térmico en *Carica papaya* L. mostró mayor sensibilidad que Fv/Fm, el índice de rendimiento en función de la absorción reveló valores de 1.9 en el genotipo Maradol, valor más bajo que el genotipo Silvestre con valores de 4.2.

En un estudio de estrés térmico por Yan *et al.* (2011), en el que se evaluaron cuatro tratamientos (40 °C durante 1 h, 40 °C por 3 h, 45 °C por 1 h y 45 °C por 2 h), en plantas de sorgo con 30 días de edad, donde tuvieron valores iniciales de 1.4 PI_{abs} , mostraron disminución significativa en los tratamientos con 40 °C por 3 h, 45 °C por 1 h y 45 °C por 2 h. Para estudiar la tolerancia al calor del PSII, estudiaron un tiempo de recuperación de 1 día a 25 °C, donde se mostraron valores tan altos como el control. Martinazzo *et al.* (2013), en discos de hojas de *Prunus pérsica* sometidos a estrés de 25, 35, 40 y 45 °C durante un período de 30 minutos por inmersión, los valores de PI_{abs} disminuyeron de 6 a 0.4 en el estrés más severo. Mathur *et al.* (2010), encontraron que a medida que aumentaba la temperatura de 25, 35, 40 y 45 °C durante 15 minutos en hojas sueltas del cultivar, Lok-1 de *Triticum aestivum*, observaron una disminución de Fv/Fm no tan

significativa como en el parámetro de PI_{abs} (índice de vitalidad), en comparación con el control, a 40 °C se redujo el valor de PI_{abs} de 2.04 (control), a 1.7, 1.03, 0.03 para temperaturas de 35, 40 y 45 °C, respectivamente.

En cambio, en respuesta a estrés por déficit hídrico los valores de Fv/Fm se mantuvieron semejantes a aquellos en condiciones control, en ambos genotipos de Maradol y Silvestre con valores de 0.83 de Fv/Fm. Sin embargo, el genotipo Silvestre mantuvo un índice de 7.5 PI_{abs} , índice mayor que el genotipo Maradol de 7 PI_{abs} . No obstante, ambos genotipos fueron capaces de recuperar los valores de Fv/Fm y su índice PI_{abs} , en este sentido el genotipo Silvestre superó los valores control con 8.1, después de 7 días con reintegración del riego y Maradol mostró valores de PI_{abs} ligeramente menores que el genotipo Silvestre. A diferencia del estrés térmico e hídrico, el tratamiento de estrés combinado (déficit hídrico más calor), por ser un estrés más severo se observó disminución significativa desde un 50% (<0.78) comparado al tratamiento control tanto en Fv/Fm como en el índice de PI_{abs} , la mayor disminución y el valor más bajo fue en el genotipo Maradol y en el genotipo Silvestre bajo también. En estudios previos han demostrado que cuando Fv/Fm está por debajo de 0.78 y de 5 PI_{abs} las plantas están estresadas y sufren daños. Respecto al tratamiento de reincorporación de riego y temperatura controlada durante 7 días, Fv/Fm pudo regresar a condiciones control, pero el índice PI_{abs} difícilmente pudo recuperarse a valores tan altos como el control. Además, nos hace pensar que el genotipo Silvestre tiene cierta tolerancia debido a valores más altos en los dos parámetros de fluorescencia y que concuerda con mejor tasa fotosintética que el cv. Maradol y en que estos valores indican que limitan la función de PSII e inhiben la vitalidad de la planta. Nuestros resultados son congruentes con lo reportado por Van *et al.* (2007) en donde los tratamientos experimentales tuvieron una influencia más fuerte en el PI_{abs} que en Fv/Fm, incluso se sabe que PI_{abs} pueden reflejar con precisión los efectos del estrés en el aparato fotosintético. Bukhov y Carpentier (2004), han respaldado la teoría de que Fv/Fm es menos sensible en la respuesta a estrés hídrico que por estrés térmico o por salinidad. Además, concuerda con los resultados de Santos *et al.* (2009) donde evaluaron cinco genotipos de frijol bajo estrés hídrico (34 días sin riego) y después de 10 días de integrar el riego, los cinco genotipos no presentaron diferencias significativas en Fv/Fm, pero sí en fotosíntesis.

En este sentido, para conocer el comportamiento del PSII de manera completa, se recomienda el estudio de la cinética OJIP (la variación de la intensidad de fluorescencia de clorofila se debe principalmente a la reducción de Q_A), ya que algunos estudios han demostrado que los parámetros derivados de la prueba OJIP muestran una mayor sensibilidad al calor que los parámetros de fluorescencia convencionales como F_v/F_m y PI_{abs} .

El comportamiento de la curva OJIP en nuestro tratamiento control, *Carica papaya* mostró un aumento polifásico típico con los pasos básicos O, J, I, P. Después de un estrés por temperatura elevada (50 °C durante 2h), se observó una disminución significativa en la intensidad de P, además mostro reducción sucesiva de los aceptores de electrones en toda la cadena transportadora de electrones, especialmente en el genotipo Maradol. La disminución de P está relacionada con la inactivación por calor del complejo productor de oxígeno (OEC), es decir, la disminución en el valor de P indica que el lado donante inactivo tiene una capacidad muy limitada para donar electrones, y que el lado donante de PSII, especialmente el OEC, está dañado. Respecto al paso J en el genotipo Silvestre alcanza el nivel más alto en el transitorio, indicando el aumento de la acumulación de Q_A debido al transporte menos inhibido de electrones más allá de Q_A . Tentativamente, sugerimos que los centros de reacción de PS II y los pigmentos antena en las hojas de papaya Silvestre poseen cierta tolerancia al calor. Por lo que, nuestro tratamiento de estrés térmico no fue severo debido a la capacidad de recuperación que mostraron ambos genotipos. Nuestros resultados concuerdan con Jedmowski y Brüggemann (2015) al someter a estrés de 45°C durante una hora dos genotipos HOR10478 y HOR12818 de cebada silvestre (*Hordeum spontaneum*), y encontraron mayor daño después de evaluar el Índice de resistencia al calor, derivado de la disminución del índice de rendimiento (PI_{abs}), F_v/F_m y parámetros empleandos para la prueba OJIP, en el genotipo HOR10478, y estos desaparecieron después de un día de recuperación a 34°C durante una hora. HOR10478 se corroboró como el genotipo más sensible y HOR12818 como el más tolerante.

En otros experimentos similares, se encontró desequilibrio en los transitorios como: en las hojas de 3 meses de edad de *Malus domestica* Borkh, en el tratamiento control mostraron un aumento polifásico típico con los pasos básicos O, J, I, P. Después de la exposición a

40 y 42 ° C, los pasos J, I y P en las hojas disminuyeron. Los principales efectos del fuerte estrés por calor (44 y 46 ° C) en el OJIP transitorio mostraron desequilibrios con los pasos característicos (Chen y Cheng, 2009). En discos foliares de *Prunus pérsica* incubados a 25, 30 y 35 °C exhibieron curvas transitorias de fluorescencia típicas. Sin embargo, los que se incubaron a 40 y 45 °C mostraron inestabilidades con los pasos característicos de OJIP. Mathur *et al.* (2010), bajo tres tratamientos de estrés (25, 35, 40 o 45 °C) en hojas sueltas del cultivar, Lok-1 de *Triticum aestivum* durante 15 minutos, el tratamiento control 25 °C exhibió un aumento polifásico característico OJIP indicativo de no estrés.

En cambio, encontramos que los transitorios del fotosistema II, son más susceptible a las condiciones de estrés hídrico en los dos genotipos Maradol y silvestre que el tratamiento de estrés térmico. En contraste con el tratamiento de estrés individual, el estrés combinado de déficit hídrico más estrés termico (14 días sin riego más 50 °C durante 2 h), se vio significativamente afectado en el transitorio polifásico de *Carica papaya* L. La reducción drástica en el rendimiento y la eficiencia de captura de electrones, lograron la pérdida parcialmente de la forma de la curva polifásica. Nuevamente, el genotipo Silvestre fue el menos afectado en respuesta a estrés combinado y que a pesar del nivel de estrés, después de 7 días de la aplicación del estrés hídrico y estrés combinado, las plantas se recuperaron con valores interesantes, pero nunca cercanas a los del tratamiento control. Lo que nos hace pensar, en el posible aumento en el número de centros Q_B no reductores (no podrán donar electrones) y una posible alteración en el complejo de liberación de oxígeno, que conduce a la baja donación de protones para el intercambio en el complejo citocromo, en la posible inactivación de ATPasa para la producción de azúcares a través del ciclo de Calvin y en la baja asimilación de CO₂, debido a la reducción de la conductancia estomática que presentaron dichos tratamientos de estrés que llevó a la reducción de absorción de energía lumínica provocando la inhibición de la actividad del centro de reacción, y que el proceso de transferencia de electrones utilizado para reducir Q_A y P_Q y que se bloquee, lo que resulta en una disminución en la cantidad de Q_A, bajando así los valores. Y sobre la capacidad de la baja tasa de recuperación en plantas de *Carica papaya* sugerimos que el daño fue mayor en el lado donante en lugar del aceptor de PSII. Para comprobar con más detalle, se propone la evaluación de más días de recuperación en papaya. Nuestros resultados concuerdan en gran parte con el estudio de Wang *et al.* (2014) al someter plantas de trigo transgénico que sobreexpresa un gen que codifica la

betaína aldehído deshidrogenasa y de tipo silvestre, el PSII disminuyó de manera significativa a estrés por altas temperaturas (40 °C durante 4h) y estrés combinado sequía y altas temperaturas (75-80% CRA durante 6 a 7 días/40 °C durante 4h), debido a la inactivación de los RC de PSII y que la disminución de la concentración de RC activos fue mucho mayor en las plantas silvestres que las transgénicas.

4.5.4 Daño en la membrana por altas temperaturas y déficit hídrico

La fuga de electrolitos o fuga de iones se ha utilizado como uno de los mejores indicadores de estrés por ser la membrana plásmática el principal objetivo de lesión, incluso se detecta casi instantáneamente después de la aplicación de un factor de estrés ambiental después de unos minutos o horas (Demidchik *et al.*, 2014). La integridad de la membrana bajo niveles de estrés acelera el movimiento de moléculas, debilitando los enlaces químicos dentro de las moléculas provocando que la bicapa lipídica sea más fluida por desnaturalización de proteínas o por un aumento de los ácidos grasos insaturados causando pérdida de electrolitos. Dichas alteraciones evidentemente aumentan la pérdida de electrolitos que se asocia a daños celulares y a la pérdida de la integridad de las membranas (Niu y Xiang, 2018; Wahid *et al.*, 2007).

De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la fuga de iones difiere con diferencias significativas entre genotipos, y tratamientos de estrés, se indica que el daño en la membrana de *Carica papaya* L. cv. Maradol fue mayor en los tres tratamientos de estrés, con valores de 19% para choque térmico, déficit hídrico (12%) y estrés combinado (66%), que lo que presentó el genotipo Silvestre con valores de fuga de electrolitos en choque térmico (17%), sequía (9%) y estrés combinado (54%). Interesante, una vez que se reincorporó el riego durante una semana, el porcentaje de fuga de electrolitos disminuyó y se mantuvo semejante en ambos genotipos (13%, Maradol y Silvestre 9%). Esto sugiere claramente que la recuperación rápida del genotipo Silvestre y la menor pérdida de electrolitos entre los tres tipos de tratamientos de estrés exista algún mecanismo de tolerancia que ayude evitar tal afectación, se ha reportado que las plantas tolerantes acumulan esteroides para enducir la pared celular, lo que conduce a una reducción de la permeabilidad de la membrana y la transpiración, como lo reportado por Kuczyńska *et al.* (2019), mediante un estudio del lipidoma entre genotipos de cebada, el genotipo MCam53 presentó un nivel más alto de la mayoría de los lípidos y esteroides, en

especial el equilibrio de β -sitosterol y campesterol, que modulan fuertemente el crecimiento y la integridad de la membrana, en condiciones de estrés. Mientras que el genotipo MPW14/19, presentó el nivel más bajo de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, por lo que fue altamente susceptible a todos los tratamientos contra el estrés, como el calor combinado y sequía. Es tentador especular que papaya silvestre podría tener mayores niveles de lípidos y esteroides y que por ello, es más tolerante que el cv. Maradol.

Respecto al estrés térmico, el patrón de respuesta en papaya es similar al reportado por Rai *et al.* (2020), al evaluar la fuga de electrolitos y el radical superóxido en un tratamiento de estrés térmico (45/25 °C durante 4 días) y recuperación (25 °C), mostraron un aumento menor de fuga de electrolitos en el genotipo tolerante en comparación con el genotipo sensible de *Brassica juncea*, después de la recuperación, el genotipo tolerante mostró el mismo nivel que en condiciones control. Este comportamiento, también coincide con el estudio de Zhang *et al.* (2005), en el que analizaron dos líneas de arroz, una considerada tolerante a altas temperaturas línea 996 y la línea sensible a altas temperaturas 4628, donde encontraron que la línea sensible a altas temperaturas, el daño en la membrana fue mayor que en la línea tolerante. Sin embargo, para comparar nuestros resultados, respecto a un experimento similar al nuestro, poco se le ha prestado a esta determinación en atención en la literatura científica. Finalmente podemos decir, que la fuga de electrolitos de la hoja funge como una medida de la termoestabilidad de la membrana de la hoja, puede proporcionar una técnica de detección indirecta eficiente para la tolerancia al estrés abiótico.

4.5.5 Intercambio de gases en respuesta a estrés térmico e hídrico

La fotosíntesis es el primer mecanismo metabólico influenciado por la variación térmica, debido a la termosensibilidad de la enzima Rubisco (ribulosa 1–5, bisfosfato carboxilasa oxigenasa) y/o de la membrana tilacoide, causando reducción o daños severos en el PSII (Buxton *et al.*, 2011). Escencialmente, se produce un daño en las clorofilas del complejo antena y el centro de reacción asociadas con la proteína D1, la proteína D1 tiene la tarea de optimizar la transferencia de electrones, en consecuencia, puede casuar fotoinhibición (inhibición por el exceso de luz), provocando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que suelen ser muy dañinas para las membranas (Taiz y Zeiger, 2003).

Es importante, reconocer que, por su anatomía foliar, la papaya exhibe fotosíntesis C₃ (Campostrini y Glenn, 2007; Imai *et al.*, 1982). Este tipo de fotosíntesis es más sensible que la fotosíntesis C₄ al enriquecimiento atmosférico de CO₂ y a la temperatura. En papaya, la fotosíntesis a menudo esta limitada por la cantidad de CO₂ disponible, además que, la fotosíntesis máxima de estas plantas esta centrada a los 25 °C, mientras que en las plantas C₄ esta a los 35 °C o más. Por otro lado, las plantas C₄ asimilan más carbono por unidad de agua absorbida, razón por la cual sus eficiencias de uso del agua son mucho más altas que para las plantas C₃ (Hull *et al.*, 2019).

Por esta razón es importante, comparar nuestros resultados con especies de metabolismo C₃. Mostramos las diferencias de la tasa fotosintética entre los genotipos de papaya en el tratamiento control, el genotipo Silvestre mostró mayor fotosíntesis que el genotipo Maradol, esto podría deberse a las características del fenotipo (mayor número y tamaño de hojas, un mayor índice de estabilidad de clorofilas o diferencias genéticas respecto a la degradación de Rubisco. La razón probable de esto puede ser que la mayor superficie de la hoja es capaz de capturar la luz máxima requerida para la fotosíntesis (Khan *et al.*, 2019). En cierta medida se puede contribuir a un mayor presupuesto de carbono, mayor contenido de nitrógeno promueve un mejor rendimiento fotosintético, mayor contenido de pigmentos foliares, como lo ocurrido en el genotipo Sunrise Solo en relación con Sunrise Golden, donde encontraron que el genotipo Sunrise Solo, presentaba un área foliar más alta, mayor contenido de clorofila y por lo tanto mayor tasa fotosintética, menor transpiración y conductancia estomática bajo condiciones control (Paixão *et al.*, 2019). Fenómeno similar a lo reportado por Jeyakumar *et al.* (2007), de los cinco cultivares de *Carica papaya* ("Co.2", "Co.5", "Co.7", "Surya" y "SunRise Solo") de 4 meses de edad, encontraron que el cultivar Co.7 tuvo una fotosíntesis mayor de 15.7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ seguido por Co.2 con valores de 13.4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y por último el cultivar SunRise Solo presentó valores de 10.1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, bajo observaciones en campo durante los meses de verano (marzo - mayo).

En nuestro caso, no obstante, aunque las plantas silvestres hayan presentado niveles de potencial hídrico más negativo (en tratamiento de alta temperatura y estrés hídrico no en el combinado), la cantidad de agua que se requiere para el proceso fotosintético es pequeña y sólo constituye, aproximadamente, un 0.01% de la cantidad total utilizada por

la planta. En este sentido, la respuesta a estrés térmico mostró un efecto menor en intercambio de gases que los tratamientos de estrés hídrico y estrés combinado. La fotosíntesis, entre los tratamientos de estrés y genotipos fueron significativamente diferentes ($P=0.007$). Con valores más altos en el genotipo Silvestre de $5.97 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que en Maradol con valores de $3.95 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el tratamiento de alta temperatura. Resultados que concuerdan con Allan (2002), quien evalúa la fotosíntesis neta de *Carica papaya* en diferentes temperaturas, encontrando la tasa máxima de fotosíntesis entre 16 y 25 °C y la mitad de la tasa fotosintética a 41 °C. Greer y Weedon (2012), observaron que las tasas promedio de fotosíntesis de las hojas de *Vitis vinifera* disminuyeron en un 60% al aumentar la temperatura de 25 a 45 °C. Actualmente, Faiz *et al.*, (2020), analizaron cuatro genotipos (25919, Nirala, 28389 y Pak-10927) de *Solanum melongena* después de la exposición al estrés por calor (45 °C) el cual mostró que el genotipo 25919 exhibió la mayor tasa fotosintética de $6.60 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a la cual consideraron tolerante a estrés térmico. Se ha observado la inhibición de la fotosíntesis después de una corta exposición a temperaturas moderadamente altas (de 35 a 40 °C) en varias especies de plantas (Sinsawat *et al.*, 2004; Crafts y Salvucci, 2000). Después del estrés por calor, la pérdida del transporte de electrones fotosintéticos se atribuyó a la termolabilidad del fotosistema II (PSII). Havaux (1996), ha demostrado que el PS II está dañado por un estrés de alta temperatura, cuando la temperatura es superior a 45 °C, mientras que la disminución significativa de la asimilación de CO_2 ya ocurre con un estrés por calor moderado.

Interesante, observar los valores de recuperación de fotosíntesis en ambos genotipos de papaya, en nuestro estudio. Un efecto similar fue observado por Brestic *et al.* (2012), en trigo cultivado en campo después de que la temperatura del aire excediera los 30 °C. Tal aclimatación rápida fotosintética probablemente se debió a la acumulación de la xantofila zeaxantina (Havaux y Tardy, 1996), que es capaz de estabilizar la fase lipídica de la membrana tilacoidea (Brestic y Zivcak, 2013). Se ha informado por Blokhina *et al.* (2003), que los genotipos tolerantes al calor mostraron mecanismos para reparar el sistema antioxidante enzimático más competente (fotoprotectores) que los genotipos de naturaleza susceptible. Es importante resaltar que la selección de una tasa fotosintética alta no ha sido generalmente un carácter prometedor para un mayor rendimiento, sin

embargo, la capacidad de las plantas para continuar una tasa relativamente, alta bajo estrés puede contribuir al aumento de la producción.

La fuerte relación que comparte la fotosíntesis con la conductancia estomática y la transpiración como mecanismo para regular el enfriamiento de las hojas para evitar el estrés por alta temperatura y, como elemento a la protección del aparato fotosintético a través del aumento de la conductancia estomática es un punto importante que considerar en la tolerancia de las plantas a estrés térmico (Urban *et al.*, 2017). De acuerdo, a los resultados presentados es interesante, que en papaya Maradol aumentara dos veces la conductancia estomática en relación con el tratamiento control, y en el genotipo Silvestre la conductancia prácticamente se mantuvo con valores control, y que probablemente se deba a nula alteración en el aumento de la temperatura de la hoja. Es relevante, observar que el mecanismo de regulación de la conductancia estomática por temperatura fue independiente del estado hídrico de la planta silvestre.

Estos datos concuerdan con el estudio de Feller (2006), en hojas de plantas de frijol de 4 semanas de edad, incubadas durante 30 minutos a 23, 30 y 35 °C observando conductancia estomática de 0,66, 2,76 y 4,28 mol H₂O m⁻² s⁻¹, respectivamente. Nankishore y Farrell (2016), encontraron diferencias significativas para la conductancia estomática y la temperatura de la hoja en tres variedades de tomate (Híbrido 61, Moskvich y Nagcarlang), la variedad Nagcarlang presentó una conductancia estomática (equipo de medición: Leaf porometer, SC-1, Decagon Devices; Pullman; WA, USA) más baja (700 mmol m⁻² s⁻¹), pero temperaturas más altas en las hojas (32 °C), lo que confirma su capacidad para tolerar el calor, mientras que el Híbrido 61 presentó una conductancia estomática de 900 mmol m⁻² s⁻¹ y temperatura en la hoja de 31°C, parece ser más efectivo para evitar el calor. Por otro lado, en un estudio, realizado por Zhou *et al.* (2015), observaron que las líneas de plántulas de tomate tolerantes al calor bajo estrés por calor tenían una conductancia estomática significativamente mayor que las líneas sensibles al calor y eran más capaces de reducir la temperatura de sus hojas a través del enfriamiento por evaporación.

Después de colocar las plantas a condiciones favorables, observamos que los valores de conductancia a los 7 días en el caso de estrés por temperatura disminuyeron, mientras en el caso de estrés por sequía y estrés combinado, aumentaron, pero en todos los casos, a

niveles más bajos que el control, para iniciar una segunda fase para administrar el agua y recuperar energía para la pronta recuperación.

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 sobreexcitación y daño a los centros de reacción del fotosistema II. En algunos casos, los estomas pueden cerrarse, evitando la entrada de CO₂ y reduciendo aún más la tasa de fotosíntesis. En este sentido, en respuesta a estrés térmico el CO₂ intercelular en hojas de *Carica papaya* fue cercano a niveles control, sin diferencias significativas entre ambos genotipos, es decir, en ambos tipos de plantas asimilaron CO₂, a pesar de tener diferencias en la actividad estomatal, mayor apertura en Maradol 0.34 y menor en Silvestre con valores de 0.15 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹, sugerimos que nuestro tratamiento no mostró inhibición de la activación de Rubisco, contrario a lo que ocurrió en tabaco y algodón, en el que el estado de activación de Rubisco disminuyó, cuando la temperatura y el C_i aumentó (Steven y Salvucci, 2000). Sin embargo, vale la pena considerar la hipótesis de que el genotipo Silvestre es capaz de almacenar más dióxido de carbono (CO₂) para combatir el estrés (o en condiciones de estrés, la menor conductancia estomática en silvestre puede indicar menos entrada de CO₂, pero también menor pérdida de este). Loehle (1995), atribuye el enriquecimiento del CO₂ a la mayor eficiencia del uso del nitrógeno que conlleva al almacenamiento de carbohidratos, además sugiere el análisis de las diferentes partes de la planta, la cantidad de biomasa, la calidad del tejido y el crecimiento, para interpretar correctamente dicho enriquecimiento (Körner, 2006).

Respecto a lo encontrado en nuestros resultados el estrés hídrico (14 días sin riego) y estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C durante 2 horas), en *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre, causó una inhibición total en la tasa fotosintética y por lo tanto un incremento en la respiración con valores de -1.96 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ en Maradol, y Silvestre de -1.70 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ y en el tratamiento combinado se detectó un valor de -2.21 para Maradol y -1.43 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ en el genotipo silvestre. Después de integrar el riego por 7 días y mantener las plantas a 25 °C, los dos tratamientos de estrés presentaron tasas fotosintéticas, con los valores más altos en el genotipo Silvestre. Es interesante los valores de respiración, estos valores pueden estar relacionados con el bajo contenido de clorofila

que se encuentran en las hojas, cierre estomático, la asimilación de CO₂, y posiblemente a una baja actividad de Rubisco, indicando un nivel de estrés severo mayor en el cv. Maradol. Estas observaciones concuerdan con los resultados de Jiang *et al.* (2000), en pasto azul de Kentucky bluegras (cv. Mystic) el cual fue sometido a sequía y/o estrés por calor (35/30°C, día y noche) durante 40 d y la combinación de estrés. La combinación de calor y sequía causaron inhibición de Pn a partir del tercer día, con valores de respiración de -4 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ a los 34 días de estrés, además evaluaron tres tiempos de recuperación en los cuales a pesar de llegar a valor menores que el nuestro, en pasto azul pudo recuperarse con niveles muy por debajo del tratamiento control de -2 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹.

A diferencia del estrés térmico, en respuesta a estrés por déficit hídrico y estrés combinado en papaya Maradol y Silvestre, se observó disminución importante de conductancia estomática y la transpiración sin diferencias estadísticas en ambos genotipos. La conductancia estomática fue ligeramente mayor en el genotipo Maradol con valores de 0.0032 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹ que en el genotipo Silvestre con valores de 0.0019 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹. En cuanto a la transpiración, el genotipo comercial obtuvo valores de 0.066 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ en contraste con el genotipo Silvestre donde su transpiración fue ligeramente menor con datos promedio de 0.040 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. Nuestro tratamiento más severo (sin riego más choque térmico) fue el tratamiento con menor conductancia estomática de los tres tratamientos de estrés, con valores de 0.0024 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹ para Maradol y para Silvestre con valores de 0.0014 mol H₂O·m⁻²·s⁻¹. Y en cuanto a la transpiración del genotipo silvestre de igual manera fue menor que la del genotipo Maradol con valores de 0.028 y 0.049 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, respectivamente. Nuestros resultados muestran una tendencia similar con lo reportado en la literatura, la cual menciona que la principal respuesta al estrés hídrico es el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua a través de la transpiración, el propósito de una menor cantidad de transpiración y reducción de la pérdida de agua a través del cierre estomático es una buena compensación para la supervivencia de papaya y muchos otros cultivos, como los cultivares de Illpa y Rainbow Quinoa de *Chenopodium quinoa* Willd (Gámez *et al.*, 2019; Pirasteh *et al.*, 2016).

En este sentido, la disminución de la conductancia estomática, que es una medida de cierre estamatal, puede conducir a disminuir la disponibilidad de dióxido de carbono (CO_2) para los cloroplastos de células mesofílicas, al bajar la entrada de CO_2 externo pero que al interior de la planta lo aumenta aunado al aumento de la respiración, condujo al aumento de la concentración interna de CO_2 en *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre, donde muestran mayor concentración de CO_2 en el genotipo Silvestre con valores de $2307.1 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ que en el genotipo Maradol con $1458.7 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$, bajo estrés hídrico. El mismo efecto presentaron los genotipos en respuesta a nuestro tercer tratamiento de estrés (combinado), con una capacidad de concentración de CO_2 de $2728.9 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ en el genotipo Maradol y en el genotipo Silvestre, sorprendentemente una concentración fue de $4388.45 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$. En la fase de recuperación las plantas mostraron valores similares a los observados en los controles. Estudios previos indicaron que la asimilación de CO_2 disminuyó bajo el estrés hídrico, mientras que la concentración intercelular de CO_2 permaneció alta, debido a la limitada capacidad del ciclo de calvin de regenerar el aceptor ribulosa 1,5 bifosfato, que limita su asimilación (Mudrik *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2002). Chechin *et al.* (2010), evaluaron el déficit hídrico en hojas jóvenes y adultas de girasol donde encontraron que el valor de C_i en hojas adultas incrementó ($253 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$) después de 6 días sin riego, que las hojas juvenes ($208 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$), incluso las hojas jóvenes se mantuvieron con valores similares al control y después de 24 horas de recuperación C_i regreso a valores control. De igual manera, la asimilación de CO_2 fueron significativamente mas afectados en el tratamiento de estrés combinado en papaya Maradol y Silvestre. Efecto similar a lo ocurrido en plántulas de dos líneas de trigo, una línea transgénica que sobreexpresa un gen que codifica betaína aldehído deshidrogenasa y la segunda línea de tipo silvestre, sometidas a estrés combinado por sequía (30%, PEG 6000) y estrés por calor (40°C durante 3 h), donde el CO_2 intercelular fue significativamente mayor en la línea silvestre con $450 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ que la línea transgenica con concentraciones de $380 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2010).

4.5.6 CpHsfA2 probablemente orquesta la red transcripcional en *Carica papaya* L. en respuesta a choque térmico y estrés combinado.

Por lo tanto, bajo estrés por altas temperaturas, el impacto fisiológico sobre la fotosíntesis, la respiración, la conductancia estomática, el PSII, la estabilidad de la membrana de las plantas de papaya, afectaron con mayor fuerza al genotipo Maradol, estos resultados hicieron comprender el nivel de tolerancia de papaya Silvestre, además del potencial inherente de la diversidad genética natural para soportar altas temperaturas. A través del estudio de la expresión de genes HSF, podemos entender mecanismos moleculares de vital importancia para desentrañar, por ejemplo, el mecanismo de tolerancia de las plantas silvestres con el objetivo de alcanzar la homeostasis en condiciones de estrés abiótico.

Con base a un análisis transcriptómico previo de *Carica papaya* por déficit hídrico (Estrella *et al.*, 2019) y con los resultados del capítulo III de esta tesis, se seleccionaron los genes con mayor número de transcritos y nivel de expresión: CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3, para retomar la siguiente pregunta ¿los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 cumplen un rol importante en la protección de la planta del genotipo Silvestres en estrés térmico e hídrico/térmico?, con la intención de seleccionar genes candidatos para mejoramiento genético en *Carica papaya* L.

Efectivamente encontramos diferencias significativas ($P=0.001$) entre los dos genotipos de *Carica papaya*, con medias más altas en el genotipo Silvestre. Respecto a estrés térmico y estrés combinado (déficit hídrico más estrés térmico), el gen con mayor nivel de expresión fue CpHsfA2, con valores de 337 ± 0.38 en estrés térmico y estrés combinado de 2727 ± 0.15 , mientras que en el genotipo Maradol el nivel de expresión fue de 0.63 ± 1.14 en respuesta a estrés térmico y estrés combinado de 2.23 ± 0.53 . Existe una amplia literatura en la que muestran que el gen HsfA2 es el dominante en la respuesta a estrés térmico, como en arroz, tomate y en *Arabidopsis* los perfiles transcriptómicos indicaron que el gen HsfA2 también se expresa en estrés hídrico y salino (Ghorbani *et al.*, 2019). Pero los niveles de transcripción son mucho más altos durante el estrés por calor (Wan *et al.*, 2019; Liu y col. 2010; Scharf *et al.*, 1998), respecto al estrés combinado existe un reporte donde el gen AtHsfA2 participa como regulador clave en estrés individual, pero también por estrés combinado (alta luminosidad y choque térmico) en *Arabidopsis thaliana* (Nishizawa *et al.*, 2006). La alta expresión del gen HsfA2 bajo un estrés combinado (déficit hídrico más

choque térmico) es el primero en la literatura científica, sugerimos que este gen es un importante candidato para la tolerancia a más de un estrés abiótico en *Carica papaya*, como lo realizado por Yokotani *et al.* (2008), la sobreexpresión del gen OsHsfA2e en *Arabidopsis thaliana* provocó 4 veces más la expresión de siete genes asociados al estrés térmico (HSP17.7, HSP26.5, HSP70, HSP101, HSP17.6, HSP17.4, y Gols1), con relación a las plantas silvestres, lo que causó mayor tolerancia a estrés térmico y estrés salino.

En condiciones control, el gen HsfA2 es apenas detectable, pero con choque térmico (HS), la acumulación de RNAm es fuertemente inducida y más abundante durante la recuperación, además el gen HsfA2 requiere una fuerte interacción con HsfA1a para una eficiente retención nuclear, transporte nuclear y actividad transcripcional en tomate (Scharf *et al.*, 1998). Años más tarde, se encontró en *Arabidopsis thaliana*, en el cuádruple mutante HsfA1a/b/d/e, indicó que el gen HsfA2 es funcional en ausencia del regulador maestro HsfA1 (Schramm *et al.*, 2006)

En otro estudio, en tomate HsfA2 fue el gen más fuertemente inducido en respuesta a HS (39°C durante 1 h) y los niveles de transcripción más bajos en las muestras control y después de un tratamiento de recuperación durante 1.5 h a 25 °C en hojas (Fragkostefanakis *et al.*, 2016). En perfiles transcriptómicos se indica que el gen HsfA2 también se expresa en estrés osmótico, salino y oxidativo en muestras de brotes y raíces de *Arabidopsis thaliana*, aunque los niveles de transcripción son mucho más altos durante el estrés por calor, esto reside en la especificidad del gen HsfA2 debido a su rápida inducción transcripcional. Es interesante, el estudio realizado por Charng *et al.* (2007), al mostrar que Glutación peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX), enzimas principales de eliminación de ROS fueron significativamente inducidas por la sobreexpresión de HsfA2.

Como lo mencionamos anteriormente, en *Carica papaya* no existe reporte de expresión del gen HsfA2 en respuesta a estrés térmico. Sin embargo, concuerdan nuestros resultados con lo antes mencionado, el gen CpHsfA2 se estimula rápidamente por una elevación de la temperatura ambiente, y fue el más responsivo, debido a que se expresó 336 veces más que en el tratamiento por déficit hídrico, en el genotipo Silvestre. Estos resultados dan pauta para estudiar la funcionalidad del gen (sobreexpresión y silenciamiento genético), la importación nuclear, para la generación de plantas

termotolerantes y el conocimiento del regulador maestro de papaya. Nuestro resultado, bajo estrés térmico es consistente con el análisis del genoma de *Prunus mume* a la 1 h después del tratamiento con estrés térmico a 42 °C, el nivel de expresión fue de 500 veces más que el tratamiento control (Wan *et al.*, 2019). Algo similar ocurrió en el estudio de Liu y col. (2010), en el que investigó la expresión de 12 HSFs de arroz de clase A y descubrieron que la mayoría de los genes OsHsfA respondían rápidamente al estrés por calor, y que la expresión de OsHsfA2a fue más alta entre los genes Hsf en respuesta al estrés por calor. Malumpong *et al.* (2019), indagaron la expresión de 7 genes (OsHsfA7, OsHsfA9, OsHsfA2e, OsHsfA4d, OsHsfA2a, OsHsfA2b, OsHsfA2d) en líneas de arroz mutantes tolerantes al calor (M9962) y susceptibles al calor (M7766) a 40–45 °C durante 6 horas, en hojas, en particular, la expresión predominante de OsHsfA2a se encontró en la línea tolerante (M9962). Sus resultados sugirieron que la tolerancia al calor de M9962 estaba protegida por la función de OsHsfA2a. Charng *et al.* (2007) tras exponer plantas a 37 °C durante 6 tiempos de estrés, encontraron que la expresión del gen HsfA2 en *Arabidopsis thaliana* se mantuvo en los diferentes tiempos, pero en los tratamientos de recuperación después de regresarlas a 24 °C se pudo observar a partir de las 4 h de recuperación los niveles de expresión disminuyeron. Este resultado concuerda con lo encontrado en esta tesis, los niveles de expresión después de 7 días de recuperación disminuyeron en los dos genotipos con valores similares al control. Y también concuerda con el estudio de Alcocer (2013), en el que la intensidad de la banda en el tratamiento de recuperación (1 semana a 25 °C) disminuyó en comparación al tratamiento de estrés térmico (50 °C durante 4 h) del genotipo Maradol.

Con niveles de expresión más bajos, los genes CpHsfA1d y CpHsfB3 también participaron en la vía de respuesta en *Carica papaya* Silvestre, se sabe que el grupo HsfA1a en tomate es el regulador único por lo que la supresión de este redujo drásticamente la termotolerancia (Mishra *et al.*, 2002). Curiosamente, se requieren otros Hsf, así como otros factores de transcripción para activar cascadas o redes reguladoras corriente abajo con funciones interesantes en termotolerancia. A diferencia del tomate donde HsfA1 actúa como el regulador maestro de la respuesta al calor, en *Arabidopsis thaliana* no se ha identificado dicho regulador maestro. Debido a que la eliminación de las subclases HsfA1a, HsfA1b y HsfA1d reducen la termo tolerancia, pero no la elimina por completo, por lo tanto, otras proteínas compensan a la clase A, sin embargo, si son necesarias para

el inicio temprano de la expresión del gen HS a nivel de transcripción (Lopmann *et al.*, 2004). En *Solanum tuberosum* en un estudio realizado por Shah *et al.* (2020), mediante transformación con el gen HsfA1d y tras la exposición a 42°C durante 1 semana en una cámara de crecimiento, se observó disminución en la clorofila a y b, y aumento en la fuga de electrolitos en las plantas Silvestres, por lo tanto, la planta con sobreexpresión del gen HsfA1d desempeñó un papel importante en la termotolerancia. Respecto a nuestros resultados, el gen CpHsfA1d se expresó por choque térmico en los dos genotipos, pero 6 veces más en el genotipo Silvestre y 4 veces más en el tratamiento por déficit hídrico en el tipo Silvestre. Sin embargo, en el tratamiento de recuperación, el genotipo Maradol mostró mayor expresión respecto al tratamiento de estrés, detectando que la respuesta en este caso fue más lenta.

Nishizawa *et al.* (2011) realizaron estudios mediante mutaciones de pérdida de función en *Arabidopsis thaliana* en el que los genes HsfA1d y HsfA1e, indicaron disminución del PSII bajo estrés térmico y que HsfA1d y HsfA1e regulan la expresión de HsfA2 y funcionan como reguladores clave de la red señalización. En tomate los genes HsfA1a, HsfA2 y HsfB1 forman una red reguladora que es responsable de la expresión de genes sensibles a choque térmico.

Por otro lado, mientras los Hsf de la clase A están asociados directamente con las respuestas al estrés por calor, lo de la clase B parecen tener diversos roles en las plantas. Se descubrió que CpHsfB1, era inducido por el estrés por calor en las hojas mientras mostraba expresión constitutiva en radículas, en papaya CpHsfB1 puede actuar junto con la clase A para regular la respuesta a calor (Tarora *et al.*, 2010). Se ha informado en tomate que HsfB1 actúa como un coactivador que interacciona con HsfA1 para regular la expresión de genes corriente abajo (Bharti *et al.*, 2004). En nuestros resultados, la subclase CpHsfB3 se indujo a altas temperaturas, pero la expresión del gen CpHsfB3 fue mayor en la de estrés hídrico, lo cual puede indicar que el gen CpHsfB3 es específico a la respuesta por déficit hídrico y que solo este participando en la vía de señalización en respuesta a estrés térmico y combinado. Por ejemplo, bajo los tratamientos de estrés a 42 °C durante 1, 2, 4, 8 y 12 h en esquejes de *Prunus mume*, la expresión del gen HsfB3 se inhibió después de la primera hora de estrés térmico (Wan *et al.*, 2019). Sin embargo, en hojas desprendidas de Tangwei (*Vitis davidii*) y Jingxiu (*Vitis vinifera*) bajo estrés por

calor (47°C durante 40 minutos) y aclimatación al calor (38 °C durante 2 h) inicialmente indicaron mediante Fv/Fm, menor termotolerancia en Jingxiu que Tangwei y la participación del gen HsfB3 con un nivel relativo de 4 veces más respecto al control durante el tratamiento de estrés por calor y una baja de 2.5 en la aclimatación en el genotipo Tangwei (Liu *et al.*, 2018), que concuerdan claramente con nuestros resultados, de igual manera el gen HsfA2 se expresó más fuertemente, en el tratamiento expuesto a tiempos cortos de estrés térmico, 50 veces más.

4.5.7 CpHsfB3 actúa con CpHsfA1d para regular la respuesta a estrés hídrico de *Carica papaya* L.

La literatura muestra el papel de los HSFs como papel central en la protección de las plantas contra altas temperaturas en diversas especies *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2011), *Solanum lycopersicum* (Mishra *et al.*, 2002), *Fragaria* (Liao *et al.*, 2016), *Oryza sativa* (Mittal *et al.*, 2009), *Carica papaya* L. (Tarora *et al.*, 2010; Alcocer, 2003), en estas especies muchos HSFs podrían regular un conjunto de genes de proteínas de choque térmico para mejorar la tolerancia térmica en las plantas. Sin embargo, pocos estudios han evidenciado la respuesta de algunos miembros de la familia de genes HSF ante un déficit hídrico como sucede con *Triticum aestivum* (Xue *et al.*, 2014), *Sesamum indicum* L (Dossa *et al.*, 2016), *Arabidopsis thaliana* (Bechtold *et al.*, 2013), *Fragaria vesca* (Hu *et al.*, 2015), *Carica papaya* (Estrella *et al.*, 2019). Documentamos, que los genes CpHsfA1d y CpHsfB3 tienen un papel en el mecanismo de tolerancia del genotipo Silvestre bajo estrés por déficit hídrico probablemente a que son genes regulados por los genes DREB como parte de la vía de señalización del estrés. Un estudio publicado por Wang *et al.* (2017), encontraron en el promotor de Hsf: clase A y B de maní, que contenían un elemento DREB, por lo que algunos Hsf podrían estar regulados por DREB como parte de la vía de señalización del estrés por sequía y en la tolerancia al estrés hídrico. Por ejemplo, la sobreexpresión de HsfA6b mejoró la expresión de DREB2A, por lo tanto, desempeñó un papel clave en la tolerancia a sequía en *Arabidopsis thaliana* (Yoshida *et al.*, 2011). Otra respuesta puede ser que además de las HSP, otras proteínas reguladoras están involucradas en las respuestas al estrés térmico, como el factor de transcripción de unión al elemento sensible a la deshidratación 2 (DREB2), la galactinol sintasa 1 (GolS1) y la peroxidasa ascorbato 2 (APX2) sugiriendo la multiplicidad de HSF de plantas y su diversidad funcional desempeñando un papel vital en la supervivencia en las plantas en diferentes condiciones de estrés abiótico. En las

plantas silvestres de *Carica papaya*, presentaron niveles de expresión altos en los tres genes (CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3). De manera sorprendente, de acuerdo con el nivel de estrés el gen CpHsfB3 tiene una mejor respuesta al estrés por déficit hídrico en *Carica papaya* L. con un valor promedio de 17.34, posteriormente el gen CpHsfA1d con menor expresión de 2.84 y por último el gen CpHsfA2 con nivel de expresión muy similar al tratamiento control con 1.05. Por lo que parece ser que la clase A está más involucrada al estrés térmico y la clase B al estrés hídrico. Al reincorporar el riego, el gen CpHsfB3 bajó su expresión a valores menores a 1. Mientras el gen CpHsfA2 mantuvo su expresión baja al igual que en el tratamiento de estrés combinado (50 °C/2 h+SQ). El gen CpHsfA1d, redujo su expresión con respecto al máximo estrés. En cuanto al genotipo comercial, los niveles de expresión de los tres genes, en promedio fue de 0.021, valores que indican que estos genes tienen una muy baja expresión en este genotipo.

Nuestros datos concuerdan con los resultados de Estrella *et al.* (2019), donde mostró mediante un análisis transcriptómico en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y silvestre en respuesta a déficit hídrico, “fold change” de 48 en el gen CpHsfB3 en el tejido de hoja en el genotipo silvestre (datos sin publicar), esto nos podría dar pauta para pensar que el gen CpHsfB3 presenta una función vital en el mecanismo molecular en defensa ante el estrés hídrico, también en que posiblemente en *Carica papaya* L., juegue un papel regulador importante en la tolerancia. Dossa *et al.* (2016), observó que la mayoría de los genes evaluados en respuesta a sequía se expresaban en gran medida en los genotipos tolerantes en comparación con el sensible, para reforzar nuestros resultados en este mismo estudio, la mayoría de los genes regulados por incremento pertenecían a la clase B y C, interesante que en respuesta a sequía el gen CpHsfA1d está regulado con bajos niveles de expresión en los dos genotipos, pero en menor grado el cv. Maradol, caso contrario en respuesta a calor donde el gen CpHsfA1d presenta valores de 7.36, mismo que actúa como principal activador y regulador de la transcripción en *Arabidopsis thaliana*, bajo estrés térmico. Xiang *et al.* (2013), estudiaron una subclase (B2b) del grupo B en arroz, el estudio demostró la inducción del gen por diversos estreses. Sin embargo, pensamos que la expresión génica es un proceso biológico complejo y se necesitan estudios más exhaustivos para descifrar los mecanismos reguladores de las funciones de Hsf. Parece ser que la clase B es interesante no solo para *Carica papaya* L. en el caso de trigo la clase B puede tener un papel regulador en la adaptación a la sequía y al estrés

salino. El perfil de la expresión en el transcurso del tiempo de los genes Hsf en respuesta al estrés por sequía mostró que el 90% de los HSFs son sensibles a la sequía. este autor infiere que las clases B podrían ser los reguladores principales de la respuesta a la sequía en el sésamo al cooperar con algunos genes de clase A. Por ejemplo, se ha informado en tomate HsfB1 actúa como un coactivador que interacciona con HsfA1 para regular la expresión de genes corriente abajo (Bharti *et al.*, 2004).

4.5.8 Relación de la expresión de los genes CpHsf s con la fuga de electrolitos como mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre en *Carica papaya* L.

Durante los tratamientos que involucran el estrés térmico: choque térmico (50 °C/2 h) y estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h), los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 participan en el mantenimiento de la membrana en el genotipo silvestre, dicha interacción parece ser importante en papaya durante altas temperaturas que induce mecanismos de protección de proteínas de choque térmico implicadas en las funciones de chaperona que protegen la mayoría de los compartimentos celulares, entre ellos se ha demostrado que las HSP y las pequeñas proteínas de choque térmico (sHSP) modulan la fluidez y la permeabilidad e interactúa con los lípidos que influyen en las propiedades físicas de la membrana (Niu y Xiang, 2018; Horváth *et al.*, 2012; Horváth *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado por Nishizawa *et al.* (2008), que la regulación transcripcional de los genes AtHsfA1a y AtHsfA2 no solo regulan la expresión de muchas proteínas HSP sino también para enzimas eliminadoras de ROS: ascorbato peroxidasa (Apx2) y galactinol sintasa (GolS), esto explica la tolerancia en el genotipo tolerante (Silvestre), y que de alguna manera concuerda con lo reportado por Zamarud *et al.* (2017), lo cual la sobreexpresión del gen AtHsfA1d en tabaco produce menor pérdida de electrolitos en relación con plantas silvestres durante el estrés térmico (42°C durante 6 días). Del mismo modo, Wang *et al.* (2016) sobre expresaron el gen CpHsfA2b en *Arabidopsis thaliana* y encontraron menor fuga de electrolitos y mayor tasa fotosintética en las plantas transgénicas durante el estrés térmico en comparación a la planta silvestre.

En cambio, el genotipo susceptible a juzgar por el nivel de expresión y la baja relación de los genes CpHsfA1d y CpHsfB3 con la reducción de fuga de electrolitos. En estrés combinado, los genes HSF en el genotipo susceptible no confiere ningún tipo de protección a la membrana. La baja relación y expresión de genes HSF explica la susceptibilidad del cv. Maradol y que está en línea con lo publicado por Chandel *et al.* (2013), lo cual encontraron diferencias de expresión de proteínas HSP y genes HSF entre genotipos, los genotipos tolerantes mostraron expresión de genes HSF más altos que los genotipos susceptibles en arroz durante el estrés térmico.

Pero durante el estrés hídrico, solo dos genes CpHsfA2 y CpHsfB3 participan en el mantenimiento de la membrana plasmática en el genotipo silvestre. Se sugiere que el gen CpHsfA1d en estrés hídrico solo funge como proteína auxiliar para la activación transcripcional. A diferencia del genotipo tolerante en el genotipo susceptible los tres genes HSF no están asociados a algún tipo de protección en la membrana. A diferencia de los genes activadores, el gen HsfB3 reportado como represor en *Arabidopsis thaliana*, se sugiere que en papaya el gen CpHsfB3 está actuando como coactivador con el apoyo de la proteína CpHsfA2 para apoyar el mantenimiento de la membrana.

4.5.9 Relación de la expresión de los genes CpHsfs y la tasa fotosintética como mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre en *Carica papaya* L.

Resulta interesante que entre mayor expresión de los genes HSF que codifican para HSP, mantenga en gran medida la estabilidad del sistema de transporte de electrones del PSII, y por ende, en la protección del aparato fotosintético durante el estrés térmico, hídrico y combinado en *Carica papaya* L. Silvestre.

Documentamos, relación positiva y significativa ($R^2=0.90$, $R^2=0.93$ y $R^2=0.92$) entre la expresión de los tres genes evaluados (CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3), y fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), bajo estrés térmico. Respecto al estrés hídrico, solo dos genes (CpHsfA1d y CpHsfB3), si están correlacionados con algún tipo de protección al proceso fotosintético y que es equivalente al mantenimiento de la tasa fotosintética. Mientras que, durante estrés combinado, los genes CpHsfA1d y CpHsfA2, presenta una correlación positiva y significativa ($R^2=0.89$ y $R^2=0.90$), con fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), en el genotipo tolerante (silvestre). Lo que sugiere que los genes HSF están asociados con la protección del aparato fotosintético. Como se mencionó anteriormente, los principales inductores de chaperonas HSP son los factores de transcripción de choque térmico. Algunos de los genes activadores más fuertes de la transcripción de HSP durante el estrés térmico en *Arabidopsis thaliana* reportados en la literatura, pertenecen a la clase A: HsfA2, HsfA3 y HsfA7a (Pierre *et al.*, 2016). Por ejemplo: en girasol, el gen HsfA9, codifica diferentes proteínas entre ellas HSP21, HSP101 y distintas pequeñas proteínas de choque térmico (sHSP). Almoguera *et al.* (2012), en la sobreexpresión del gen

HaHsfA9 en *Nicotiana tabacum*, llevó a una mejora en la protección de la membrana, también protegió a la proteína D1, que bajo estrés causa la reducción de la liberación de oxígeno en el PSII y la interrupción del flujo de electrones entre el PSII y PSI, (las plántulas transgénicas tenían un mayor contenido/estabilidad de proteína D1 que las plántulas no transgénicas), bajo estrés hídrico (desechación 4 horas en la oscuridad) y estrés oxidativo (solución de H₂O₂ durante 24 en oscuridad). Aunado a ello, se ha reportado en la literatura, que la HSP21 fungen como protectoras del PSII, durante el estrés térmico (Neta *et al.*, 2005).

El aumento de la tasa de producción de O₂ y el contenido de H₂O₂, efectos por estrés abiótico y que dañan principalmente el aparato fotosintético, inactivando enzimas del ciclo de Calvin, los genes HSF corriente abajo activan genes que funcionan como osmoprotectores, genes involucrados en las rutas relacionadas con las enzimas antioxidantes como: ascorbato peroxida (APX), característicos en la protección del estrés oxidativo impuesto por ROS, cuyo incremento durante el estrés hídrico en algodón se ha asociado en el mantenimiento de la tasa fotosintética relacionada con la integridad de los fotosistemas (Yi *et al.*, 2016).

Por tal motivo, los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en papaya podrian estar implicados en la producción de HSP, sin embargo, es necesario el análisis de proteínas para identificar el tipo, bajo los diferentes tratamientos de estrés.

Por otro lado, el genotipo susceptible (maradol), bajo estrés térmico e hídrico, solo el gen CpHsfB3 presentó una correlación positiva pero no significativa en ambos tratamientos de estrés. Respecto al estrés combinado, la expresión de los tres genes HSF no confieren protección al aparato. Sugerimos que es importante la interacción de los genes HSF para la producción de chaperonas HSP, como lo mencionado por Pierre *et al.* (2016), en tomate SIHsfA1 y SIHsfB1 puede apoyar la producción de HSP, mientras que solo SIHsfB1 reprime la producción de HSP además del incremento de los genes evaluados para la producción de HSP puede ser beneficiosa para la producción de genotipos con un mecanismo más eficiente en el aparato fotosintético bajo estrés abiótico de *Carica papaya*.

4.5.10 Relación de la expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 y el índice de rendimiento cuántico del PSII como mecanismo de tolerancia en el genotipo Silvestre en *Carica papaya* L.

Dicho lo anterior, resulta interesante que los genes HSF que codifican para HSP, protejan al sistema de transporte de electrones del PSII. Encontramos, bajo estrés térmico e hídrico en *Carica papaya* L. Silvestre, relación positiva y significativa, entre la expresión de los tres genes evaluados (CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3) con PI_{abs} . Mientras que a estrés combinado (déficit hídrico más choque térmico), 2 de los 3 genes HSF (CpHsfA1d y CpHsfA2) se relacionaron con el índice de rendimiento cuántico del PSII. Lo que sugiere que en el genotipo tolerante (Silvestre) a mayor expresión de los genes HSF, mayor eficiencia en la cadena de transporte electrones durante el estrés. Nuestros resultados de cierta manera se pueden deber a la acumulación de HSP, como lo reportado por Scott *et al.* (2002), donde el genotipo tolerante al calor de *Agrostis stolonifera* produce una isoforma de sHSP adicional no producida por el genotipo susceptible. Además, indicaron mayor cantidad de sHSP en el genotipo tolerante. También se conoce que las sHSP protegen la cadena de transporte de electrones y el transporte de electrones del PSII durante el estrés por calor (Niu y Xiang, 2018). Interesante, es que estas proteínas estén localizadas en el citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico, mitocondrias y cloroplastos. La HSP21, localizada en cloroplastos y controlada por el factor de transcription HsfA2 en *Arabidopsis thaliana* (Yu *et al.*, 2012). Proteínas HSP21 reportadas en tomate, como protectoras del PSII y además de promover la acumulación de caratenoides durante la maduración de la fruta al exponer la planta a estrés térmico (Neta *et al.*, 2005). Sin embargo, el cómo algunos de los genes HSF protegen al transporte de electrones es un tema aun poco conocido.

Por otro lado, el cv. Maradol, durante el estrés térmico la expresión de los 3 genes HSF tuvo una correlación negativa, durante el estrés por déficit hídrico, se encontró una correlación positiva entre el aumento en la expresión de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.66$ y $R^2=0.63$). Mientras que, en estrés combinado, el gen A2 si presenta correlación positiva (aunque baja) con PI_{abs} .

4.5.11 Relación entre los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en respuesta a estrés térmico, hídrico y combinado

La interacción entre los factores de transcripción se requiere para activar genes de una manera más eficiente (superactivación) que los factores individuales. Por ejemplo, en tomate Scharf *et al.* (1998), encontraron que la interacción es específica entre HsfA1/HsfA2, pero no con HsfB1. Dicha interacción conduce a exportación nuclear eficiente, es decir, mediante expresión transitoria en protoplastos de tabaco, el factor individual HsfA2 se retiene en el citoplasma, a menos que interaccione con HsfA1, la exportación será nuclear. Poco se ha investigado al respecto bajo diferentes tratamientos de estrés en *Carica papaya* L., nosotros documentamos mediante análisis de correlación, interacción positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.83$), CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.89$) y CpHsfA2 y CpHsfA1d ($R^2=0.65$) durante el estrés térmico e hídrico. En estrés combinado existió relación significativa entre los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 ($R^2=0.94$), los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.67$), pero no de CpHsfA1d y CpHsfB3 en el genotipo Silvestre. Dicha relación entre los niveles de expresión de genes HSF sugiere, que se activan diversas interacciones en la red reguladora, probablemente por los grados de estrés, es decir, existen genes de respuesta temprana y tardíos, los genes de respuesta temprana pueden ser remplazados por los genes tardíos durante el estrés abiótico, por ejemplo: HsfA1a/HsfA1b son de respuesta temprana y HsfA2 de respuesta tardía del estrés térmico (Li *et al.*, 2010). Nuestros resultados están en línea con lo publicado hasta el momento en *Arabidopsis thaliana* durante estrés térmico, el gen HsfB1/HsfB2b interactúa con HsfA1a, HsfA1b y HsfA2 (Kumar *et al.*, 2009; Bharti *et al.*, 2004). El gen HsfA1d y HsfA1e activan la transcripción de HsfA2 y HsfA7b. HsfA1a/HsfA1b regulan la expresión de HsfA7a, HsfB1 y HsfB2a. Además, HsfA2 regula la expresión de HsfA3, HsfB1 y HsfB2a, incluso los genes HsfA1d y HsfA2 activan a enzimas eliminadoras de ROS: ascorbato peroxidasa (Apx2) y galactinol sintasa (Nishizawa *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha mostrado que HsfA2 por si sola no puede iniciar la expresión del gen en respuesta a estrés térmico, el cv. Maradol presentó correlación positiva entre los niveles de expresión de los mismos genes, pero no significativa ($R^2<0.45$). En estrés

combinado (déficit hídrico más térmico), mostró correlación positiva entre los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.67$). Probablemente la susceptibilidad del cv. Maradol se deba a la baja interacción entre los genes mencionados, sin embargo, se recomiendan otros estudios para aseverar supuesta hipótesis.

4.6 CONCLUSIONES

Estrés Térmico

- El potencial hídrico y el CRA de las plantas expuestas a estrés térmico en comparación a estrés hídrico y combinado, fue el menos afectado. Las hojas del genotipo silvestre mantienen potenciales hídricos menores (-1.5 MPa) que del cv. Maradol (-0.78 MPa), en cambio el genotipo Silvestre puede mantener el CRA más alto (86%) que Maradol, esto sugiere que el genotipo Silvestre usa el agua de manera más eficiente, que se puede atribuir a las diferencias fenotípicas y requerimientos de agua.
- En relación con la fuga de iones como indicador importante del daño en la membrana, nuestros resultados apuntan mayor daño en los tratamientos que involucran estrés térmico (choque térmico y déficit hídrico más choque térmico). En respuesta a choque térmico el genotipo Maradol presenta mayor daño (19%) en relación con el genotipo Silvestre (17%), después del estrés, la fuga de electrolitos del genotipo Silvestre regresó a valores más cercanos al control que Maradol, esto sugiere claramente que la recuperación rápida del genotipo Silvestre y la menor pérdida de electrolitos en el estrés térmico existe algún mecanismo de tolerancia que ayude a evitar tal afectación.
- Los parámetros PI_{abs} y Fv/Fm disminuyeron en forma importante, nuestros datos muestran una mayor sensibilidad en la alteración del PSII en los tratamientos que involucran estrés térmico y en el genotipo Maradol (choque térmico y déficit hídrico más choque térmico). En respuesta a estrés térmico, el análisis del transitorio de fluorescencia (OJIP), mostró que a los 2 milisegundos (ms) se presenta menor flujo de electrones en ambos genotipos, con menor eficiencia en el cv. Maradol con relación al genotipo silvestre, el estrés térmico (50 °C/2 h) no provocó daño significativo en el complejo productor de oxígeno por su capacidad de recuperación en los dos genotipos. Además, nuestros resultados muestran que los valores de PI_{abs} pueden servir como un índice de sensibilidad al estrés en plantas de *Carica papaya* L..
- En relación con los parámetros de intercambio de gases, la fotosíntesis fue menor en el genotipo Maradol en respuesta a estrés térmico. El aumento de la temperatura estimuló mayor conductancia estomática y transpiración en el

genotipo Maradol. El CO₂ intercelular se mantuvo con valores similares en relación con las plantas control en los dos genotipos de *Carica papaya* en respuesta a estrés térmico.

- Bajo estrés térmico, los genes CpHsA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 cumplen un rol importante en la protección de la planta del genotipo Silvestre. El gen CpHsfA2 presentó el mayor nivel de expresión, por lo que parece ser más específico a la respuesta a choque térmico, a juzgar por los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d y CpHsfB3 también participan en esa vía de respuesta. La expresión de estos genes en el genotipo comercial fue menor de 1.02, mientras que el nivel de expresión del genotipo Silvestre fue de 337. Por lo que sugerimos que los genes HSF son importantes para la tolerancia a estrés térmico en genotipos silvestres de *Carica papaya*.

Estrés Hídrico

- El potencial hídrico de las plantas expuestas a estrés hídrico disminuyó en forma importante. Con el cual se enfatiza en el hecho de que al dejar de regar el contenido de agua en la planta puede estar afectado y presentar un déficit de agua y así decir, que la planta si sufrió un estrés hídrico. El potencial hídrico de hojas del genotipo Silvestre (-2.06 MPa) fue menor que en las del genotipo Maradol (-1.7 MPa). Con relación al contenido relativo de agua se comportó de manera similar en ambos genotipos (84%).
- La fuga de iones como indicador del daño en la membrana celular, no fue tan evidente en ambos genotipos en este tipo de estrés como en el estrés térmico y combinado. Por lo que se sugiere que la membrana es más sensible al estrés térmico que al estrés por déficit hídrico. El genotipo Silvestre presentó menor fuga de electrolitos (9%) con relación al genotipo Maradol (12%), lo que apunta nuevamente a una tolerancia mayor del genotipo Silvestre en *Carica papaya*.
- Por el contrario, el índice de PI_{abs} y Fv/Fm disminuyó ligeramente con relación al control y menos que lo observado en el estrés térmico y estrés combinado. El análisis completo del fotosistema II, señala que los dos genotipos de *Carica papaya* se comportaron de manera muy similar, desde la absorción de fotones hasta la reducción de quinona primaria.

- Con relación a parámetros de intercambio de gases, la fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática disminuyeron considerablemente en relación con el tratamiento control y estrés térmico. La reducción de la conductancia estomática en los dos genotipos de papaya (Silvestre $0.0019 \text{ mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y Maradol $0.0032 \text{ mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) reguló la menor tasa de transpiración (Silvestre, $0.04 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y Maradol, $0.06 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para tratar de mantener el potencial de agua en los dos genotipos. Las altas concentraciones de CO_2 en el genotipo Silvestre de $2307.1 \text{ } \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$ con relación al genotipo Maradol con valores de $1458.7 \text{ } \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$, sugieren que Rubisco actuó como oxigenasa produciendo fotorespiración (Silvestre $-1.70 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y Maradol de $-1.96 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mismos que limitó a la reducción del carbono neto fijado por el ciclo de calvín.
- En respuesta a déficit hídrico, la expresión de los genes CpHsA1d y CpHsfA2 fueron menor a 2.8 en el genotipo Silvestre y 1 en el genotipo comercial. Por otro lado, el gen CpHsfB3 presentó mayor nivel de expresión (17.34), por lo que parece ser más específico a la respuesta a estrés por déficit hídrico. La expresión de estos genes en el genotipo comercial fue menor de 1 por lo que sugerimos que los genes HSF son importantes para la tolerancia a estrés hídrico en genotipos silvestres de *Carica papaya*.

Estrés combinado (déficit hídrico más choque térmico)

- El potencial hídrico y el CRA de las plantas expuestas a estrés combinado disminuyó de forma importante. Diferente a los tratamientos anteriores, el potencial hídrico de hojas del genotipo Silvestre (-2.6 MPa) fue menor que el genotipo comercial de -2.9 MPa, del mismo modo el CRA fue más afectado en el genotipo Maradol con valores de 55% y el genotipo Silvestre de 67%. Del mismo modo, después de la reincorporación del riego, Maradol es capaz de recuperar su potencial hídrico a -0.84 MPa mientras que el genotipo silvestre presentó valores de -1.0 MPa después de las 168 h de integrar el riego. Sin embargo, los datos del CRA demuestran lo contrario, el genotipo Maradol presentó un contenido de agua menor que el genotipo Silvestre.
- El tratamiento que más afectó a nivel de daño en la membrana fue el estrés combinado en ambos genotipos. El genotipo Silvestre presentó menor daño en la membrana (fuga de electrolitos, 54%), apuntando nuevamente a la tolerancia a estrés combinado en comparación al genotipo comercial (fuga de electrolitos, 66%), a pesar de la pérdida significativa de fuga de iones, después de reincorporar las plantas a condiciones control, los dos genotipos fueron capaces de recuperarse del daño.
- El índice de PI_{abs} y Fv/Fm disminuyó significativamente con relación al control y de los tratamientos anteriores en ambos genotipos. Los datos mostraron que el genotipo Silvestre presentó mayor rendimiento y eficiencia de captura de electrones en respuesta a estrés combinado, que explica la mayor tasa fotosintética con relación a las plantas del genotipo comercial. A pesar de la alteración, en la curva polifásica, después de 7 días de la aplicación del estrés combinado, las plantas se recuperaron con valores interesantes, pero nunca cercanas a los del tratamiento control.
- Con relación a parámetros de intercambio de gases, la respuesta fue similar a la de estrés por sequía. La fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática disminuyeron considerablemente en relación con el tratamiento control para evitar la pérdida de agua. El genotipo Silvestre presentó mayor CO_2 intercelular, es decir, menor fijación neta de CO_2 y menor fotorespiración en comparación a los tratamientos de estrés térmico, hídrico y que el genotipo Maradol.

- Respecto a la expresión de los tres genes evaluados, es interesante el nivel de expresión del gen CpHsfA2 (2727.49) comportamiento similar a la respuesta a estrés por choque térmico, aunque los genes CpHsfA1d y CpHsfB3 también parece que participan en esa vía de respuesta. La expresión del gen CpHsfB3 fue a la baja respecto al tratamiento de déficit hídrico y térmico. Estos genes en el genotipo comercial fueron menores con relación al genotipo silvestre de *Carica papaya*.

Conclusiones Generales

Aspectos fisiológicos y expresión de genes

Bajo condiciones de estrés térmico

- El estrés térmico, en el genotipo silvestre, induce un aumento en la expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3, que a su vez aparentemente dispara mecanismos (tal vez proteínas chaperonas tipo HSP) para evitar daño en membrana, dicho mecanismo explica al menos parcialmente, la mayor tolerancia a estrés térmico presentada por el genotipo silvestre. Por el contrario, la susceptibilidad del genotipo maradol al estrés térmico, parece estar asociada al hecho de que en este genotipo el estrés térmico no induce un aumento en la expresión de estos genes, y por consiguiente no se disparan mecanismos de protección a membrana.
- En lo que se refiere a fotosíntesis, el estrés térmico indujo un aumento de los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 que estuvo asociada a un efecto protector del aparato fotosintético ante dicho estrés. Lo que sugiere que los genes HSF están asociados con la protección del aparato fotosintético en el genotipo tolerante. Por el contrario, en el caso del genotipo susceptible (Maradol) solo el gen CpHsfB3 presentó una correlación positiva entre un aumento en su expresión con el mantenimiento del funcionamiento del aparato fotosintético.
- Los cambios en la expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 están relacionados con un efecto protector al funcionamiento del aparato fotosintético en respuesta a estrés térmico e hídrico en genotipos tolerantes de *C. papaya* L., se fortalece con el hecho de que los cambios de expresión de HSF también están

correlacionados con una mayor eficiencia en el transporte de electrones (Plabs) ante dichos tipos de estrés en el genotipo Silvestre bajo estrés térmico.

En condiciones de estrés hídrico

- Durante el estrés hídrico, solo dos genes CpHsfA2 y CpHsfB3 participan en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática en el genotipo Silvestre. Se sugiere que el gen CpHsfA1d en estrés hídrico solo funge como proteína auxiliar para la activación transcripcional. A diferencia del genotipo Silvestre, en Maradol el estrés térmico no induce un aumento en la expresión de ninguno de los tres genes HSF, y por consiguiente no se disparan mecanismos de protección a membrana.
- En respuesta a estrés hídrico, solo dos genes CpHsfA1d y CpHsfB3 parecen jugar un papel importante en la protección del aparato fotosintético en *Carica papaya* L. Silvestre. Por el contrario, en el genotipo susceptible a estrés hídrico no indujo cambios en la expresión de genes HSF y por consiguiente no se dispararon mecanismos de protección al funcionamiento del aparato fotosintético durante este estrés.
- Del mismo modo, en respuesta a déficit hídrico, a mayor expresión de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 mayor eficiencia en el transporte de electrones del PSII al PSI en el genotipo tolerante. Lo que sugiere que la expresión de dichos genes está involucrada en la protección del aparato fotosintético ante este tipo de estrés. Por el contrario, en el genotipo susceptible (Maradol) la expresión de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 se encontraron asociados en menor medida a algún tipo de protección al aparato fotosintético durante el estrés hídrico.

En condiciones de estrés combinado

- El estrés combinado también induce un aumento en los niveles de expresión en los 3 genes HSF, asociado a una mayor protección de la integridad de la membrana ante dicho estrés en el genotipo Silvestre. Por el contrario, en el genotipo Maradol, el estrés combinado no induce un cambio significativo en los niveles de expresión de los genes HSF, y por consiguiente no se dispararon mecanismos de protección a membrana.
- En lo que se refiere a la protección del aparato fotosintético, durante el estrés combinado, solo dos genes CpHsfA1d y CpHsfA2 parecen jugar un papel importante en la protección del aparato fotosintético en *Carica papaya* L. Silvestre. Por el contrario, en el genotipo susceptible, el estrés combinado no indujo cambios significativos en la expresión de ninguno de los genes HSF y, por consiguiente, no se dispararon mecanismos de protección al aparato fotosintético ante dicho estrés combinado.
- Durante el estrés combinado, solo dos genes HSF (CpHsfA1d y CpHsfA2) parecen jugar un papel importante en mantener la eficiencia de transporte de electrones en el genotipo Silvestre, en presencia del estrés. Mientras que en Maradol (genotipo susceptible), el ligero cambio en expresión de los genes HSF, no confiere protección al funcionamiento del aparato fotosintético ante un estrés combinado.

Correlaciones entre los niveles de expresión entre genes

- Durante el estrés térmico, en el genotipo Silvestre (tolerante) se encontró una alta correlación entre los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 ($R^2=0.75$), CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.83$), CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.89$). Por el contrario, en el genotipo susceptible (Maradol), se presentó una correlación positiva, pero no significativa entre los niveles de expresión de los mismos genes, y nula relación entre los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 durante el estrés térmico.
- En respuesta a estrés hídrico, nuevamente en el genotipo Silvestre (tolerante) encontramos que los tres genes HSF están altamente correlacionados. Sobresale la alta correlación entre el gen CpHsfA1d y CpHsfB3 ($R^2=0.98$), y de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 ($R^2=0.86$), y CpHsfA1d y CpHsfA2 ($R^2=0.78$). Mientras que

en el genotipo Maradol (susceptible) no existe correlación entre los niveles de expresión de los tres genes.

- En relación con el estrés combinado, en el genotipo Silvestre (tolerante) los niveles de expresión de los genes CpHsfA1d y CpHsfA2 están correlacionados significativamente ($R^2=0.94$). Por lo que se sugiere que ambos genes participan en la activación del mecanismo de protección en *Carica papaya* L. Por el contrario, no se encontró correlación entre los niveles de expresión entre CpHsfA1d y CpHsfB3 en ninguno de los dos genotipos Maradol y Silvestre ($R^2=0.25$ y $R^2=0.28$). En el caso de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 solo el genotipo Maradol (susceptible) presentó una correlación positiva entre estos genes ($R^2=0.67$).

CAPÍTULO V INTEGRACIÓN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES

5 DISCUSIÓN GENERAL

5.1 Los genes HSFs como mecanismo de tolerancia a estrés hídrico, térmico y la combinación de ambos en *Carica papaya* L.

En la naturaleza, los cultivos encuentran una combinación de estrés abiótico que limitan severamente el crecimiento y la producción de los cultivos. En el presente estudio se exponen los cambios fisiológicos de una línea de tipo C7 en diferentes tiempos de estrés y dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre al déficit hídrico, estrés térmico y su combinación, y además su posible mecanismo molecular en respuesta a la tolerancia mediante expresión de genes HSF, esto con la intención de contribuir al futuro trabajo de investigación dirigido al desarrollo de plantas cisgénicas con mayor tolerancia a las condiciones ambientales.

De acuerdo con los parámetros fisiológicos analizados (potencial hídrico, CRA, fuga de electrolitos, intercambio de gases y de fluorescencia de clorofila), en la presente tesis se observó en respuesta a estrés térmico (50 °C durante 2 h): que la reducción en el estado hídrico del agua y la fotosíntesis fue menor en comparación al estrés hídrico y combinado. El aumento de la conductancia estomática durante el estrés por calor se considera un mecanismo de adaptación para mejorar la transpiración, el cual fue menor en el genotipo Silvestre, esto podría deberse a la capacidad de tolerar el calor a un nivel más alto, mientras que el cv. Maradol tuvo que aumentar sus niveles de conductancia y transpiración para tolerar las altas temperaturas en las hojas, a pesar de ello, su fotosíntesis fue menor con relación al genotipo Silvestre. El daño en la membrana fue mayor en respuesta a estrés térmico que hídrico y condujo a cambios en la distribución de energía entre los fotosistemas y en la cadena transportadora de electrones en mayor medida en el cv. Maradol que el genotipo Silvestre. En este sentido, después de integrar el riego y condiciones de temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días, fueron necesarios para que los parámetros fisiológicos considerados en los dos genotipos regresaran a valores muy cercanos al control, excepto la transferencia de electrones en el PSII, en menor escala el genotipo Maradol.

Durante los diferentes tiempos de estrés hídrico (7, 14, 21 d; sin riego) en plantas de la línea de tipo C7, la conductancia estomática se vio afectada conforme avanzaban los

días sin riego. A los 21 d sin riego, las plantas mostraron el potencial de agua menor con valores de -1.70 MPa, sin daños significativos en el PSII (Fv/Fm). La tasa de fotosíntesis se vio afectada a partir de los 7 d (de 7 a 3.06 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), posiblemente por la disminución de la tasa de transpiración (de 6.5 a 2.3 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la menor concentración de CO_2 (332 a 275 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$).

En cambio, el estrés hídrico y el estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h), en las plantas de *Carica papaya* L. presentaron daños mucho más evidentes en el cv. Maradol (susceptible) que el genotipo Silvestre. El estrés hídrico y la combinación de estrés tienen mecanismos de respuesta en común (potencial hídrico e intercambio de gases), pero diferentes relacionadas con fluorescencia de clorofila y fuga de electrolitos. Es interesante y concordante con lo mencionado por Rizhsky *et al.* (2002), en que el estrés por calor no redujo significativamente la actividad fotosintética de las plantas de tabaco, pero el estrés por sequía y el estrés combinado por calor y sequía mostraron una reducción de más del 80% en la actividad fotosintética. A diferencia del estrés térmico e hídrico, en el que 7 días fueron necesarios para revertir las alteraciones fisiológicas a niveles cercanos al control, el estrés combinado mostró un daño no reversible en el rendimiento del fotosistema II. El estrés hídrico y el efecto combinado de déficit hídrico más estrés térmico afectó significativamente el CRA y el potencial hídrico de las hojas de *Carica papaya* L., cv. Maradol y Silvestre, incluso la reducción sustancial del CRA de la hoja y la conductancia estomática condujo al daño extenso a las membranas en términos de fuga de electrolitos, rendimiento fotosintético de manera importante. El estrés térmico y el efecto combinado aumentaron el nivel de fuga de electrolitos, lo que indica daño en la membrana que podría deberse a alteraciones en la conformación lípido-proteína y pérdida del funcionamiento celular. En particular, en el estrés combinado con mayor pérdida de electrolitos en el cv. Maradol de 66% y en el genotipo Silvestre de 54% el impacto en el funcionamiento del fotosistema II (Fv/Fm), el rendimiento cuántico y en el transporte de electrones tuvo un impacto más negativo en las hojas de las plantas Maradol que el estrés individual térmico e hídrico. Nuestros resultados concuerdan con los análisis previos de Osório *et al.* (2011) y Zhou *et al.* (2017) donde el estrés individual de déficit hídrico y estrés combinado tienen un impacto mayor que el calor individual en plantas de *Ceratonia siliqua* y *Solanum lycopersicum*.

Se conoce que el estrés térmico y los efectos interactivos del calor y la sequía causa estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conduce a la peroxidación lipídica, y daño a la estabilidad de la membrana celular, el aparato fotosintético y la biosíntesis de clorofila (Raja *et al.*, 2020; Horváth *et al.*, 2008). Para evitar el daño y recuperar la homeostasis, una de las respuestas es la activación de la maquinaria de eliminación de ROS, y la producción de HSP al actuar como chaperonas moleculares, evitando las conformaciones de proteínas nocivas y la desnaturalización de proteínas que ocurre durante el estrés. En particular las proteínas de choque térmico se han relacionado y las pequeñas proteínas (HSP) como uno de los objetivos protegidos del PSII. La sHSP se une a las membranas tilacoides para proteger la evolución de O₂ y el mantenimiento de la síntesis de proteínas, incluida la D1 el PSII y el transporte de electrones durante el estrés por calor, además se descubrió que HSP21 funcionaba como una chaperona molecular para proporcionar protección al PSII del estrés oxidativo dependiente de la temperatura (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Como lo describe Zha *et al.* (2016), en el estudio de dos cultivares de *Vitis vinífera* L., Kyoto y Jumeigui, bajo estrés térmico de 35 °C a 45 °C durante 6 horas el cultivar Jumeigui mostró mayor daño en la actividad del PS II que el cultivar Kyoto, y que esto se pudo correlacionar con el nivel de expresión de GLOS1, HsfA2 y HSP21 que fue en mayor medida en el cultivar tolerante Kyoto. También se ha demostrado que las HSPs modulan la fluidez y la permeabilidad de la membrana al interactuar con proteínas de la membrana, lípidos de membrana o ambos. Como lo demuestra Torok *et al.* (2001), donde la HSP17 desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la membrana en condiciones de estrés. Por otro lado, en un análisis cuantitativo de proteínas de nuestro grupo de trabajo, Romero (2018), en las hojas de papaya Silvestre encontraron un incremento importante en la concentración de proteínas durante su tiempo máximo de estrés hídrico en comparación al cv. Maradol, además se identificaron proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 en los dos genotipos de papaya, y sugieren que papaya silvestre expresa HSP a niveles más altos y que tendría sentido para justificar la tolerancia de estrés hídrico y térmico en el genotipo Silvestre.

Las proteínas HSP están reguladas por factores de transcripción de choque térmico (HSF) a través de su asociación con un motivo de unión palindrómica (5'-nAGAA_nTTCT_n-3') en la región promotora HSE (Tolosa y Zhang, 2020; Driedonks *et*

al., 2015). Lo cual desempeñan un papel central en la respuesta al estrés por calor, recientes investigaciones han mostrado que los HSF también se expresan en respuesta a estrés hídrico y salino, y la sobreexpresión de genes HSF favorecen a la tolerancia en *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* tanto estrés térmico como hídrico (Gong *et al.*, 2014).

En este sentido, los genes HSFs, con base a sus características estructurales se clasifican en tres clases A, B y C. Los HSF contienen un dominio de unión al DNA (DBD), dominio de oligomerización (regiones HR-A/B), señal de localización nuclear, señal de exportación nuclear y solo los de la clase A presentan el motivo de activación (motivo AHA) que son esenciales para la transactivación. Y los de la clase B y C contienen un dominio de represión identificado con un péptido con cuatro aminoácidos **-KLFQV-** (Ikeda *et al.*, 2011). En *Arabidopsis thaliana* se han reportado 21 secuencias pertenecientes a la familia HSF, mientras que en *Carica papaya* L. cv. SunUp encontramos 18 secuencias, consistente con la reducción en el número de genes de 20% que presenta *C. papaya* en relación a *Arabidopsis thaliana*, y en un análisis transcriptómico, realizado por Estrella *et al.* (2019), identificamos 11 genes HSF en respuesta a déficit hídrico: CpHsfA1b, CpHsfA1d, CpHsfA2, CpHsfA4a, CpHsfA9, CpHsfA6b, CpHsfB3, CpHsfB2a, CpHsfB1, CpHsfB2b y CpHsfC1, de los cuales 8 fueron analizados en el capítulo III bajo estrés hídrico en tres genotipos Maradol, Silvestre y la línea C7, posteriormente se seleccionaron los genes inducidos en los diferentes tiempos de estrés hídrico (CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3) que fueron analizados en el capítulo IV en respuesta a estrés térmico (50 °C/2 h), estrés hídrico (14 días sin riego) y la combinación de ambos (14 días sin riego más 50 °C/2 h).

Cada uno de los 21 HSF en *Arabidopsis thaliana* y los 18 HSF de *Carica papaya* tienen una función en la regulación y cooperan en las fases de respuesta de estrés, en *Carica papaya* durante los tratamientos que involucran el estrés térmico: choque térmico (50 °C/2 h) y estrés combinado (14 días sin riego más 50 °C/2 h), los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 participan en el mantenimiento de la membrana en el genotipo silvestre, dicha interacción parece ser importante en papaya durante altas temperaturas que induce mecanismos de protección de proteínas de choque térmico implicadas en las funciones de chaperona que protegen la mayoría de los compartimentos celulares, entre

ellos se ha demostrado que las HSP y las pequeñas proteínas de choque térmico (sHSP) modulan la fluidez y la permeabilidad e interactúa con los lípidos que influyen en las propiedades físicas de la membrana (Niu y Xiang, 2018; Horváth *et al.*, 2012; Horváth *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado por Nishizawa *et al.* (2008), que la regulación transcripcional de los genes AtHsfA1a y AtHsfA2 no solo regulan la expresión de muchas proteínas HSP sino también para enzimas eliminadoras de ROS: ascorbato peroxidasa (Apx2) y galactinol sintasa (GolS), esto explica la tolerancia en el genotipo tolerante (Silvestre), y que de alguna manera concuerda con lo reportado por Zamarud *et al.* (2017), lo cual la sobreexpresión del gen AtHsfA1d en tabaco produce menor pérdida de fuga de electrolitos en relación con plantas silvestres durante el estrés térmico (42 °C durante 6 días). Del mismo modo, Wang *et al.* (2016) sobre expresaron el gen CpHsfA2b en *Arabidopsis thaliana* y encontraron menor fuga de electrolitos y mayor tasa fotosintética en las plantas transgénicas durante el estrés térmico en comparación a la planta silvestre.

A saber, que los centros de reacción de PSI y PSII en los cloroplastos son los principales sitios de generación de ROS, aunque los ROS también se generan en otros orgánulos, peroxisomas y mitocondrias (Soliman *et al.*, 2011). Los genes HSF ayudan a desintoxicar ROS (activando enzimas desintoxicantes, eliminadores de radicales libres); reactivar las enzimas esenciales y las proteínas estructurales para mantener la homeostasis celular. Además del gen HsfA2, se ha informado que los HSF de *Arabidopsis thaliana* AtHsfA1a y AtHsfA1b no solo regulan la expresión de muchas proteínas HSP sino también para enzimas eliminadoras de ROS: ascorbato peroxidasa (Apx2) y galactinol sintasa (GolS). Interesante que, los genes AtHsfA1d y AtHsfA1e pueden lograr la función de AtHsfA1a y AtHsfA1b en los análisis de mutantes de *Arabidopsis thaliana*. De los genes de la clase A, el gen AtHsfA2 fue el mayor expresado en 30 minutos bajo estrés térmico (Nishizawa *et al.*, 2006). De igual modo la sobreexpresión del gen HsfA2 en *Arabidopsis thaliana* ha propiciado a mayor tolerancia a estrés térmico, osmótico y un mayor crecimiento de callos (Ogawa *et al.*, 2007). De lo contrario, al silenciar el gen AtHsfA2 las plantas mostraron una disminución de la tolerancia al estrés, por lo que se sugiere que AtHsfA2 es un regulador clave para la termotolerancia adquirida y la tolerancia anoxia en *Arabidopsis* (Banti *et al.*, 2010). También se ha confirmado que al sobreexpresar el gen AtHsfA2 los niveles de galactinol sintasa y rafinosa sintasa 2

(fungen como osmoprotectores), aumentaron en comparación con los de las plantas de tipo silvestre en condiciones normales de crecimiento y sugieren la posibilidad de que el galactinol y la rafinosa eliminen los radicales hidroxilos como una función nueva para proteger las células vegetales del daño oxidativo causado por el tratamiento de salinidad y frío (Nishizawa *et al.*, 2008). En este sentido, se ha obtenido la evidencia de que la expresión de APX1 esta regulada por HsfA2: la sobreexpresión de HsfA2 dio como resultado una mayor expresión de APX1, mientras que los mutantes Knock out AtHsfA2 mostraron una expresión menor de APX1, las líneas de sobreexpresión de AtHsfA2 mostraron una mayor tolerancia al calor y estrés oxidativo (Li *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha informado de la relación de SIHsfA1 y SIHsfA2 para la formación de heterooligómeros, interacción esencial para la importación nuclear de SIHsfA2 y la potencia de activación de la expresión de genes responsables de estrés por choque térmico (Heerklotz *et al.*, 2001).

A diferencia de la clase A, los HSF de la clase B no tienen una función evidente como activadores de la transcripción por si mismos, sin embargo, se demostró que HsfB1 funciona como un nuevo corregulador del tomate HsfA1 o HsfA2 que mejora su actividad transcripcional (Miller y Mittler, 2006). Bajo estrés hídrico, el gen CpHsfB3 tiene una mejor respuesta al estrés por déficit hídrico en *Carica papaya* L., Silvestre con un valor promedio de 17.34. Mientras que el gen CpHsfA1d presenta expresión en menor nivel de 2.84. El gen CpHsfA2 mostró una baja expresión en respuesta al estrés por déficit hídrico con nivel de expresión muy similar al tratamiento control con 1.05, mientras que en el genotipo Maradol los niveles de expresión para los tres genes fueron <1.5. En este sentido, en *Carica papaya* el gen CpHsfB3 parece ser que actúa como un coactivador de CpHsfA1d como lo ocurrido en tomate donde el gen LpHsfB1 presentó interacción con LpHsfA1 y LpHsfA2 (Bhartier *et al.*, 2004). Así mismo, nuestros datos de correlación entre los niveles de expresión de CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 mostró relación significativa pero solo dos genes (CpHsfA1d y CpHsfB3), están correlacionados con algún tipo de protección al proceso fotosintético y que es equivalente al mantenimiento de la tasa fotosintética con $R^2=0.90$ y $R^2=0.91$, solo la expresión de CpHsfA2 no parece conferir protección al proceso fotosintético ($R^2=-0.80$) y solo participa en la activación transcripcional. Así mismo, los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 tuvieron una correlación positiva, entre menor fuga de electrolitos y mayor nivel de expresión en el genotipo

silvestre, lo contrario al genotipo susceptible. Esto señala que es posible que diferentes Hsf activen o controlen diferentes vías de defensa bajo diferentes condiciones de estrés, por ejemplo, Rizhsky *et al.* (2004), cuando sometió hojas a estrés hídrico o estrés hídrico combinado con calor expresaron HSP específicos que no se encontraron en las hojas tratadas con estrés por calor. Por lo tanto, la función combinatoria de HSF podría ser responsable de la expresión específica de estrés de HSP u otros genes de defensa, y las condiciones específicas de estrés podrían causar la activación de un conjunto particular de diferentes HSF, como lo ocurrido en nuestro trabajo en *Carica papaya*. De igual modo, nuestro resultado es concordante con Dossa *et al.* (2016), donde observó que el gen SiHsfB3 en *Sesamum indicum* bajo estrés hídrico se expresaban en gran media en los genotipos tolerantes en comparación con el sensible, además que, en su estudio, la mayoría de los genes con mayor expresión bajo estrés hídrico pertenecían a la clase B y C.

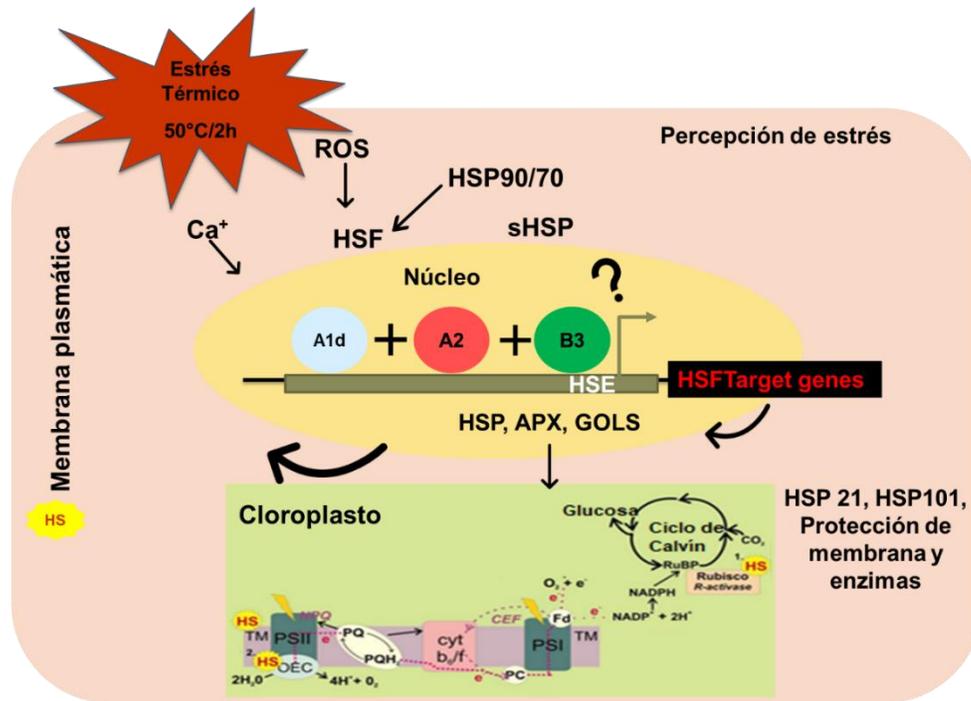


Figura 5.1 Modelo hipotético de la participación de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en la tolerancia de *Carica papaya* L. Silvestre bajo estrés térmico. 1) Al percibir la célula, la señal de estrés térmico (50 °C/2 h), las proteínas HSP70 y HSP90 se unen a los HSF, se oligomerizan a un estado trimérico y se traslocan al núcleo donde se unen a la zona promotora HSE para iniciar la transcripción de genes HSFs, estos genes corriente abajo activan a genes que funcionan como osmoprotectores, genes involucrados en las rutas relacionadas con las enzimas antioxidantes como galactinol (GOLs) y ascorbato peroxidasa (APX) y la síntesis de proteínas HSP en los diferentes compartimentos celulares, entre ellos en la membrana de tilacoide, el estroma y la membrana plasmática. 2) Las proteínas HSP, protegen al complejo de liberación de oxígeno (OEC), la vía del estado redox plastoquinol, y tal vez a la enzima Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Figura 4.11 y 4.14). Por otro lado, los bajos niveles de expresión de los tres genes y de acuerdo con los análisis de correlación (Figura 4.20), la baja interacción entre los niveles de expresión en el cv. Maradol, sea causa de mayor daño en la membrana plasmática y el flujo de electrones. En orden por nivel de expresión de mayor a menor: CpHsfA2 en círculo rojo, CpHsfB3 en círculo verde y CpHsfA1d en círculo azul.

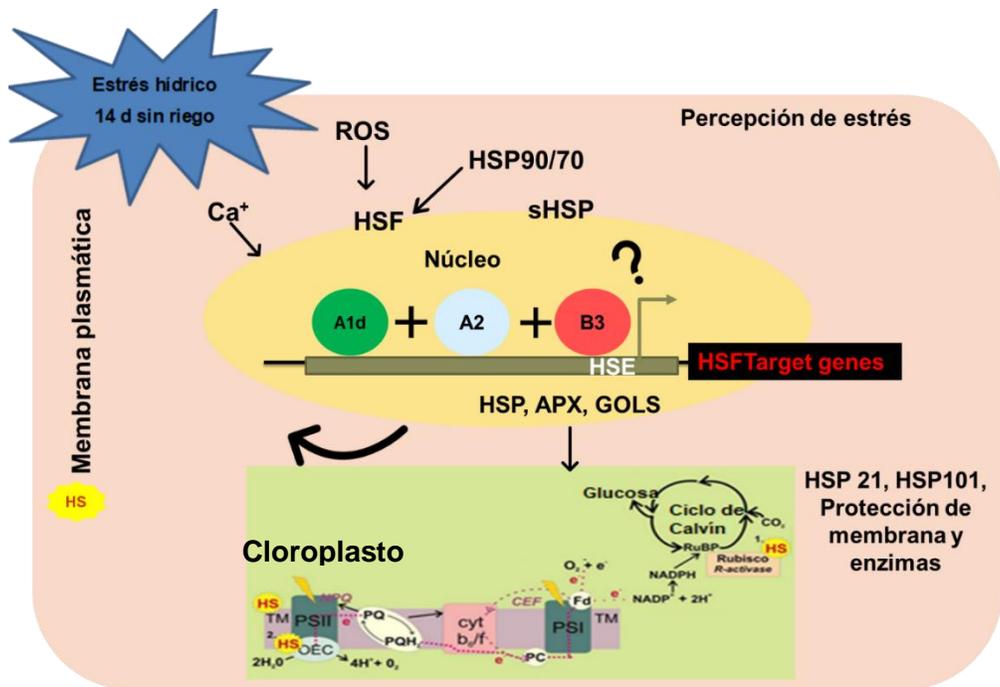


Figura 5.2 Modelo hipotético de la participación de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en la tolerancia de *Carica papaya* L. Silvestre bajo estrés por déficit hídrico. 1) Al percibir la célula, la señal por déficit hídrico (14 días sin riego), las proteínas HSP70 y HSP90 se unen a los HSF, se oligomerizan a un estado trimérico y se traslocan al núcleo donde se unen a la zona promotora HSE para iniciar la transcripción de genes HSFs, estos genes corriente abajo activan a genes que funcionan como osmoprotectores, genes involucrados en las rutas relacionadas con las enzimas antioxidantes como galactinol (GOLS) y ascorbato peroxidasa (APX) y la síntesis de proteínas HSP en los diferentes compartimentos celulares, entre ellos en la membrana de tilacoide, el estroma y la membrana plasmática. 2) Las proteínas HSP, protegen la membrana plasmática, al complejo de liberación de oxígeno (OEC), la vía del estado redox plastoquinol y tal vez a la enzima Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Figura 4.12, 4.15 y 4.18). Por otro lado, los bajos niveles de expresión de los tres genes y de acuerdo con los análisis de correlación (Figura 4.20), la baja interacción entre los niveles de expresión en el cv. Maradol, sea causa de mayor daño en la membrana plasmática y el flujo de electrones. En orden por nivel de expresión de mayor a menor: CpHsfB3 en círculo rojo, CpHsfA1d en círculo verde y CpHsfA2 en círculo azul.

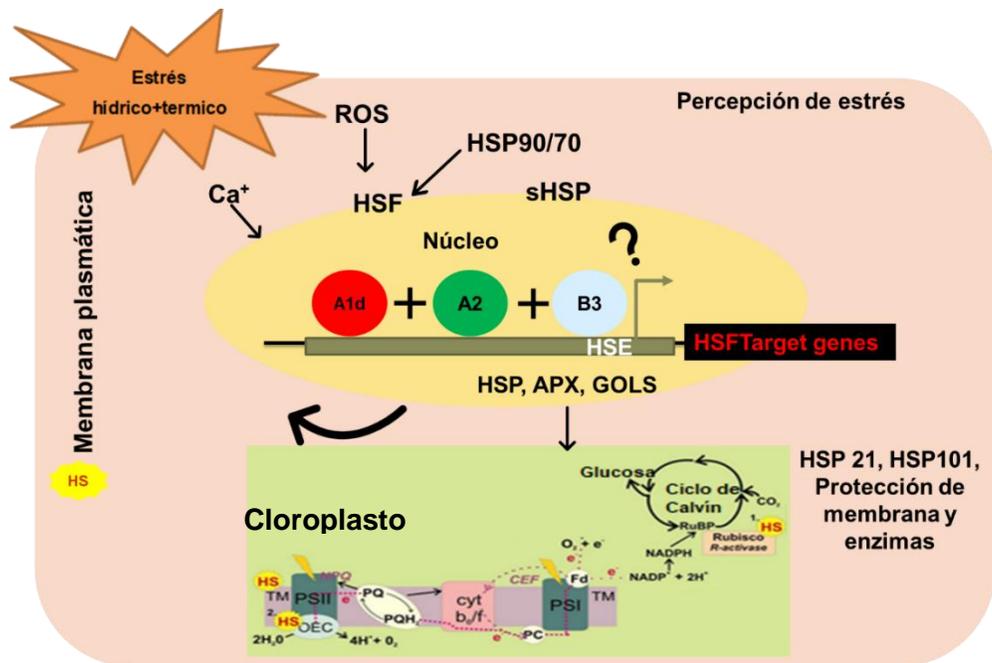


Figura 5.3 Modelo hipotético de la participación de los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 en la tolerancia de *Carica papaya* L. Silvestre bajo estrés combinado de déficit hídrico más choque térmico (14 días sin riego más 50 °C/2 h). 1) Al percibir la célula, la señal de estrés, las proteínas HSP70 y HSP90 se unen a los HSF, se oligomerizan a un estado trimérico y se traslocan al núcleo donde se unen a la zona promotora HSE para iniciar la transcripción de genes HSFs, estos genes corriente abajo activan a genes que funcionan como osmoprotectores, genes involucrados en las rutas relacionadas con las enzimas antioxidantes como galactinol (GOLs) y ascorbato peroxidasa (APX) y la síntesis de proteínas HSP en los diferentes compartimentos celulares, entre ellos en la membrana de tilacoide, el estroma y la membrana plasmática. 2) Las proteínas HSP, protegen la membrana plasmática, al complejo de liberación de oxígeno (OEC), la vía del estado redox plastoquinol y tal vez a la enzima Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Figura 4.13, 4.16 y 4.19). Por otro lado, los bajos niveles de expresión de los tres genes y de acuerdo con los análisis de correlación (Figura 4.20), la baja interacción entre los niveles de expresión en el cv. Maradol, sea causa de mayor daño en la membrana plasmática y el flujo de electrones. En orden por nivel de expresión de mayor a menor: CpHsfA2 en círculo rojo, CpHsfA1d en círculo verde y CpHsfB3 en círculo azul.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- Con base a los análisis bioinformáticos realizados en el capítulo II, se encontraron un número menor de secuencias HSFs (18) en *C. papaya* L. cv. SunUp en relación con *Arabidopsis thaliana* (21). Se encontraron 4 subclases adicionales en *Arabidopsis thaliana* (AtHsfA1e, AtHsfA4c, AtHsfA6a, AtHsfA7b), de las encontradas en *Carica papaya* cv. SunUp, esto probablemente por la reducción promedio en el número de genes de aproximadamente 20%, que presenta *Carica papaya* L. cv. SunUp en relación con *Arabidopsis* e identificamos 11 genes con altos porcentajes de identidad de 93.6-100 % de los cuales se agruparon en 3 clases: A (6), B (4) y C (1) (HsfA1b, HsfA1d, HsfA2, HsfA4a, HsfA6b, HsfA9, HsfB1, HsfB2a, HsfB2b, HsfB3 y HsfC1) en *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre.
- De acuerdo con los parámetros fisiológicos en los diferentes tiempos de estrés hídrico en la línea C7 (capítulo III), la suspensión del riego provocó que los valores de potencial hídrico fueran menores, para evitar la pérdida de agua y turgencia, las plantas disminuyeron la transpiración y la conductancia estomática a partir de los 7 días de estrés, como consecuencia las plantas presentaron la misma tendencia de concentración interna de CO₂ en los diferentes tiempos de estrés. La alta capacidad al mejorar su estatus hídrico favoreció que la línea C7 se recuperara rápidamente del estrés. Las plantas estresadas permitieron conocer la respuesta molecular mediante la expresión cualitativa de genes HSF comparando con dos genotipos Maradol y Silvestre donde el nivel de expresión de los genes CpHsfA1a, CpHsfA1b, CpHsfB1, y CpHsfC1 fue constitutiva en los genotipos Maradol, Silvestre y la línea C7 de *Carica papaya* L. Por el contrario, los genes CpHsfA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 están involucrados en la respuesta a déficit hídrico en los diferentes tiempos de estrés hídrico.
- En el capítulo IV, mediante la integración de tres tipos de estrés abiótico: déficit hídrico, estrés térmico y la combinación en dos genotipos de *Carica papaya* L. cv. Maradol y Silvestre demuestran diferentes impactos en los mecanismos fisiológicos y moleculares. Los mecanismos se manifiestan de las siguientes maneras diferentes. Estrés térmico: 1) El estado hídrico de la planta es mayor en estrés por calor, 2) La fuga de electrolitos es más sensible al calor y el estado fotoquímico del PSII, 3) El aumento de la conductividad estomática incrementa la

transpiración y la asimilación del CO₂, causa mayor fotosíntesis en relación con el estrés por déficit hídrico, bajo estas condiciones los genes CpHsA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 participan en la vía de respuesta, pero por sus altos niveles de expresión CpHsfA2 en el genotipo Silvestre lo consideramos un componente central para la protección celular contra estrés térmico.

- Déficit hídrico: 1) el potencial hídrico disminuyó en forma importante, la fuga de electrolitos fue menos sensible al estrés hídrico y al daño en el PSII en el genotipo Silvestre, pero el máximo cierre estomático para evitar pérdida de agua por transpiración, propicio a incrementos en la respiración y por lo tanto una baja asimilación de CO₂ intercelular. Diferente a estrés térmico y combinado el gen con mayor nivel de expresión fue CpHsfB3 en el genotipo Silvestre, esto señala que es posible que diferentes HSF activen o controlen diferentes vías de defensa bajo diferentes condiciones de estrés.
- Estrés combinado: Las afectaciones fisiológicas fueron más severas que en los tratamientos de estrés individual. 1) La limitación estomática es una de las razones del potencial hídrico menor y que el daño en la membrana fuera mayor además de que el aparato fotosintético fue significativamente más afectado, todos estos daños fueron más evidentes en el cv. Maradol. Bajo esta condición fisiológica los genes CpHsA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3 presentaron niveles de expresión, pero con mayor intensidad que estrés térmico, se expresó el gen CpHsfA2 en el genotipo Silvestre, lo que nos hace pensar en su rápida respuesta debido a las condiciones de estrés hídrico más térmico.
- Nuestros resultados sugieren que la tolerancia del genotipo Silvestre de *Carica papaya* L. en los diferentes tratamientos de estrés (hídrico, térmico y combinado) se debe a los altos niveles de expresión de genes CpHsA1d, CpHsfA2 y CpHsfB3, que a su vez aparentemente dispara mecanismos (tal vez proteínas chaperonas tipo HSP) para evitar daño en membrana, en mantener la eficiencia del transporte de electrones y en la protección del aparato fotosintético, dicho mecanismo explica al menos parcialmente, la mayor tolerancia. Por el contrario, la susceptibilidad del genotipo maradol al estrés, parece estar asociada al hecho de que en este genotipo los tratamientos de estrés evaluados se encontraron asociados en menor

medida a algún tipo de protección a la membrana, en mantener la eficiencia del transporte de electrones y en la protección del aparato fotosintético.

- Nuestros resultados del análisis de la expresión de genes de la respuesta al estrés por sequía, estrés térmico y combinado, nos permite proponer que los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 deben ser clonados y se debe realizar estudios funcionales para comprender mejor su función y tal vez ser la base para mejorar la tolerancia a estrés abiótico en esta importante especie tropical.

5.3 PERSPECTIVAS

El presente estudio reporta aspectos importantes sobre la fisiología y la expresión de genes HSFs de tres tipos de *Carica papaya* L. expuestos a tres tratamientos de estrés abiótico (hídrico, térmico y una combinación de ellos) y sus respectivos tiempos de recuperación. Los análisis de correlaciones parecen sugerir que los genes HSFs están involucrados en mantenimiento de la integridad de la membrana celular y el aparato fotosintético jugando un papel importante en la tolerancia a estrés en las plantas silvestres de *C. papaya*. Además, es una primera aproximación para entender la compleja red de interacción de los genes HSFs, dichos resultados permiten plantearnos nuevas preguntas en futuros estudios experimentales, para comprender mejor el papel de estos genes en los mecanismos de tolerancia a estrés abiótico en especies tropicales como la papaya.

- Se requieren más estudios de silenciamiento genético para confirmar el papel de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 como genes maestros en la respuesta a estrés abiótico.
- Además, se propone el estudio a nivel proteínas de los tilacoides de la planta transformada, para conocer si en efecto los genes HSF protegen al aparato fotosintético.
- Los altos niveles de expresión de los genes CpHsfA2 y CpHsfB3 encontrados en el genotipo tolerante (papaya Silvestre) convierte a estos genes en candidatos para aumentar la tolerancia a estrés hídrico y térmico en esta especie. Por lo que se propone la clonación, transformación, análisis funcionales de estos genes en *Arabidopsis thaliana* y en genotipos susceptible como papaya Maradol.

5.4 LITERATURA CONSULTADA

- Acevedo, E y Fereres, E (1993). Resistance to abiotic stresses, en: Hayward, M.D.; Bosemark, N.O.; Romagosa, T. (Ed.), *Plant Breeding* (406-421). Plant Breeding, City: Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 406-421.
- Ahmed, I., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D y Wu, F (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiol Biochemistry*, 63, 49– 60.
- Albihlal, WS., Obomighie, I., Blein, T., Persad, R., Chernukhin, I., Crespi, M., Bechtold, U y Mullineaux, P (2018). *Arabidopsis* HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b regulates multiple developmental genes under benign and stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 69(11), 2847-2862.
- Alcocer, C. (2013). 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 de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 204.
- Alhaithloul, H (2019). Impact of Combined Heat and Drought Stress on the Potential Growth Responses of the Desert Grass *Artemisia sieberi* alba: Relation to Biochemical and Molecular Adaptation. *Plants*, 8 (10), 416.
- Allakhverdiev, S., Kreslavski, V., Klimov, V., Los D Carpentier y Mohanty, P (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98 (1-3), 541-550.
- Allan, P y de Jager, J (1978). Net photosynthesis in *Macademia* and paw paw and the possible alleviation of heat stress. *Acta Horticulturae*. 7, 125-129.

- Allan, P. (2002). *Carica papaya* responses under cool subtropical growth conditions. *Acta Horticulturae*, (575), 757–763.
- Allan, P., Mc Chlery, J y Biggs, D. (1987). Environmental effects on clonal female and male *Carica papaya* L. plants. *Scientia Horticulturae*, 32(3-4), 221–232.
- Almoguera, C., Dapena, P., Personat, J., Cano, J., Lindahl, M., Espejo, A y Jordano, J (2012). Protection of the Photosynthetic Apparatus from Extreme Dehydration and Oxidative Stress in Seedlings of Transgenic Tobacco. *Plos One*, 7(12), e51443.
- Antunes, C y Renner, S (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65: 46–53.
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796-815.
- Arango, L.V., Roman, C.A., Salamanca, C.R., Almansa, E.F., Bernal, J.H., León, G.A., Rey, V.E., Ariza, M y Gómez, P (2000). El cultivo de la papaya en los llanos orientales de Colombia. Manual de Asistencia Técnica. Villavicencio, Colombia. pp. 96.
- Argentel, L., Garatuza, J., Armendáriz, M., Yépez, E., Arredondo, J y González, J (2017). Estrés térmico en cultivo del trigo. Implicaciones fisiológicas, bioquímicas y agronómicas. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 57-67.
- Asthir, R (2015). Mechanisms of heat tolerance in crop plants. *Biologia Plantarum*, 59(4),620-628.
- Bajji, M., Kinet, J y Lutts, S (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 36, 61-70.

- Banti, V., Mafessoni, F., Loreti, E., Alpi, A y Perata, P (2010). The Heat-Inducible Transcription Factor HsfA2 Enhances Anoxia Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152,1471-1483.
- Barber, I., Baird, D.J y Calow, P (1994). Effect of cadmium and ration level on oxygen consumption, RNA concentration and RNA-DNA ratio in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 30(3), 249–258.
- Bechtold, U., Albihlal, W., Lawson, T., Fryer, M., Sparrow, P., Richard, F., Persad. R., Bowden, L., Hickman, R., Martin, C., Jim, L., Beynon, Buchanan Wollaston V., Baker, N., Morison J., Friedrich, Schöffl., Sascha, Ott y Philip, M (2013). *Arabidopsis* Heat Shock Transcription FactorA1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3467-3481.
- Bharti, K., Schmidt, E., Lyck R., Heerklotz D., Bublak, D y Scharf, KD (2000). Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *The Plant Journal*, 22(4), 355-365.
- Bharti, K., Von Koskull Doring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschl Korbitzer, A., Treuter, E y Nover, L (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. *Plant Cell*, 16, 1521–1535.
- Blokhina, O., Virolainen, E y Fagerstedt, K (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Bohnert, H y Jensen, R (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, 14(3), 89-97.
- Boyer, J (1968). Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiology*, 43(7), 1056-62.

- Brestic, M y Zivcak, M (2013). PSII Fluorescence Techniques for Measurement of Drought and High Temperature Stress Signal in Crop Plants: Protocols and Applications. *Molecular Stress Physiology of Plants*, 87–131.
- Bukhov, N y Carpentier, R (2004). Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynthesis Research*, 82(1), 17-33.
- Bulman, A.L., Hubl, S.T y Nelson H.C (2001). The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N and C terminal activation domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 40254-40262.
- Buxton, L., Takahashi, S., Hill, R y Ralph, P.J (2011). Variability in the primary site of photosynthetic damage in *symbiodinium* Sp. (dinophyceae) exposed to thermal stress. *Journal of Phycology*, 48(1), 117–126.
- Cai, Y., Abdullah, M y Cheng, X (2019). Regulatory Sequences of Pear. In: Korban S. (eds) The Pear Genome. *Compendium of Plant Genomes*. Springer, Cham. pp 153–177.
- Camejo, D., Jiménez, A., Alarcón, J., Torres, W., Gómez, J y Sevilla, F (2006). Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants. *Functional Plant Biology*, 33(2), 177.
- Campos, P., Quartin, V., Ramalho, J y Nunes, M (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, 160(3), 283–292.
- Campostrini, E y Glenn, D (2007). Ecophysiology of papaya: a review. *Plant Physiology*, 19(4), 413-424.
- Carr, M (2014). The Water Relations and Irrigation Requirements of papaya (*Carica papaya* L.): a review. *Experimental Agriculture*, 50(2), 270–283.

- Carvalho, F.A y Renner, S.S. (2014). The Phylogeny of the Caricaceae. In: Ming R., Moore P. (eds) Genetics and Genomics of Papaya. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, vol 10. Springer. New York, NY. pp. 81-92.
- Cechin, I., Corniani, N., Fumis, T y Cataneo, A (2010). Diferentes respostas entre folhas adultas e jovens de plantas de girassol ao estresse oxidativo causado pelo déficit hídrico. *Ciencia. Rural*, 40(6), 290-1294.
- Chandel, G., Dubey, M y Meena, R (2013). Differential expression of heat shock proteins and heat stress transcription factor genes in rice exposed to different levels of heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3), 277–285.
- Charf, K., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E y Nover, L (1998). Needs Interaction with HsfA1 for Efficient Nuclear Import and May Be Localized in Cytoplasmic Heat Stress Granules. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 2240.
- Charng, Y., Liu, H., Liu, N., Chi, W., Wang, C., S Chang y T. T. Wang (2007). A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143, 251-262.
- Chaves, N y Gutiérrez, M (2017). Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agronomía. Mesoamericana*. 28(1), 237-253.
- Chávez, M (2018). La papaya silvestre, el reservorio natural de una especie de gran valor. *Desde el Herbario CICY*, 10, 83–87.
- Chávez, M y Núñez, J (2017). Domestication and Genetics of Papaya: A Review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5(1), 155.
- Chen, C., Zhang, K., Khurshid, M., Li, J., He, M., Georgiev, M. I., Xinquan, Z y Zhou, M. (2019). MYB Transcription Repressors Regulate Plant Secondary Metabolism. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1–12.

- Chen, L y Cheng, L (2009). Photosystem II is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. *Photosynthetica*, 47(1), 112–120.
- Chung, E., Kim, K y Lee, J (2013). Genome-Wide Analysis and Molecular Characterization of Heat Shock Transcription Factor Family in *Glycine max*. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(3) ,127-135.
- Cicero, M.P., Hubl, S.T., Harrison, C.J., Littlefield, O., Hardy, J.A y Hillary, C.M (2001). The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic Acids Research*, 29(8),1715–1723.
- Clarke, S., Mur, L., Wood, J y Scott, I (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 38, 432-447.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, L y Tonelli, C (2005). A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Current Biology*, 15(13): 1196-1200.
- Comisión Nacional del Agua, 2019. Monitor de Sequía de México. [On line] (Actualizado 20 mayo 2019).
Disponibile en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/>
[Acesso 8 junio 2018].
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2008. Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. [On line] (Actualizado 19 diciembre 2008).
Disponibile en: www.conabio.gob.mx
[Acesso 8 junio 2018].

- Concepción, A., Prieto, P., Personat, J., Tejedor, J., Lindahl, M., Diaz, A y Jordano, J (2012). Protection of the Photosynthetic Apparatus from Extreme Dehydration and Oxidative Stress in Seedlings of Transgenic Tobacco. *PLoS One*, 7(12), e51443.
- Costa, M.D., Artur, M.A., Maia, J., Jonkheer, E., Derks, M., Nijveen, H., Williams, B., Sagadevan, G. M., Jiménez, J.M., Hesselink, T., Schijlen, E., Ligterink, W., Melvin, J. O., Farrant, J.M y Henk, W. M. (2017). A footprint of desiccation tolerance in the genome of *Xerophyta viscosa*, *Nature Plants*, 3(4), 17038.
- Crafts, S y Salvucci, M (2000). Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24),13430-13435.
- Critchley, C y Smillie R.M (1981). Leaf Chlorophyll Fluorescence as an Indicator of High Light Stress (Photoinhibition) in *Cucumis sativus* L. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8(2),133-141.
- Czarnecka, E., Pan, S., Salem, T y Gurley, W (2004). Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Molecular Biology*, 56(1), 57-75.
- Czarnecka, E., Yuan, C.X., Scharf, K. D., English, G y Gurley, W.B (2000). Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Molecular Biology*, 43, 459-471.
- Damberger, F.F., Pelton, J. G., Harrison, C. J., Nelson, H. C y Wemmer, D. E (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein science: A Publication of the Protein Society*, 3(10), 1806–1821.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S., Pozhvanov, G y Sokolik, A (2014). Stress induced electrolyte leakage: the role of K⁺ permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*,65 (5),1259-1270.

- Desjardins, P y Conklin, D (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (45), 2565.
- Dhekney, S.A., R. Kandel., D.R. Bergey., V. Sittler., K. Soorianathasundaram y R.E. Litz. (2016). Advances in papaya biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 5 (1), 133–142.
- Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., Chen, A y Nover, L (2000). Role of AHA motifs for the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell*, 12, 265–278.
- Dossa, K., Diouf, D y Cissé, N (2016). Genome-Wide Investigation of Hsf Genes in Sesame Reveals Their Segmental Duplication Expansion and Their Active Role in Drought Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1522.
- Drees, B., Grotkopp, E., Hillary, C y Nelson, H (1997). The GCN4 leucine zipper can functionally substitute for the heat shock transcription factors trimerization domain. *Journal of Molecular Biology*, 273 (1), 61-74.
- Driedonks, N., Xu, J., Peters, J., Park, S y Rieu, I (2015). Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Frontiers in Plant Science*, 6, 999.
- Duan, S., Liu, B., Zhang, Y Guoliang Li y Gluo X (2019). Genome-wide identification and abiotic stress-responsive pattern of heat shock transcription factor family in *Triticum aestivum* L. *BMC Genomics*, 20(1), 257.
- Estrella, H., Girón, A., Fuentes, G., Góngora, E., Peraza, S., O. Martínez y J.M. Santamaría (2019). Native Carica papaya: developing transcriptome resources to study water-deficit stress. *Acta Horticulturae*, 1250, 77-84.

- Faiz, H., Ayyub, C.M., Khan, R.W y Ahmad, R (2020). Morphological, physiological, and biochemical responses of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedling to heat stress. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(2), 371-380.
- FAO (2007). Handbook on Pressurized Irrigation Techniques. Drip Irrigation, Rome. pp. 282.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A y Siddique, K.H.M (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. In: Aroca R. (eds) Plant Responses to Drought Stress. Springer, Berlin Heidelberg. pp. 1-33.
- Feller, U (2006). Stomatal Opening at Elevated Temperature: An Underestimated Regulatory Mechanism? *General and Applied Plant Physiology*. Special Issue, 19-31.
- Fisher, J. B (1980). The vegetative and reproductive structure of papaya (*Carica papaya*). *Lyonia*, 1(4),191-208.
- Font Quer, P (1965). Diccionario de botánica. Editorial Labor S.A., Barcelona. pp. 182-183.
- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, 2020 Crops [Online] Actualizado 10 agosto 2020).
Disponibile en: www.faostat.org
[Acesso 10 agosto 2020].
- Fragkostefanakis, S., Mesihovic, A., Simm, S., Paupière, M., Hu, Y., Mishra, S., Tschiersch, B., Theres, K., Bovy, A., Schleiff, E y Scharf, K (2016). HsfA2 Controls the Activity of Developmentally and Stress-Regulated Heat Stress Protection Mechanisms in Tomato Male Reproductive Tissues. *Plant Physiology*, 170(4), 2461.
- Fuentes, G y Santamaría, J.M. (2014) Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. In: Ming R., Moore P. (eds) Genetics and Genomics of Papaya. Plant

Genetics and Genomics: Crops and Models, vol 10. Springer, New York, NY. pp 3-15.

Gámez, A., Soba, D., Zamarreño, Á., García Mina, J., Aranjuelo, I y Morales, F (2019). Effect of Water Stress during Grain Filling on Yield, Quality and Physiological Traits of Illpa and Rainbow Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Cultivars. *Plants*, 8(6), 173.

García, M.A (2010). Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). Guía Técnica del cultivo de papaya. Ciudad Arce La Libertad República, el Salvador. Disponible en: <http://www.centa.gob.sv>.

García, S., Gómez, F.C., Trejo, L.I y Herrera, E.B (2013). Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2), 105-115.

Gengxian, Z (2018). Estudio funcional del factor de transcripción de choque térmico de *Arabidopsis* HSFC1. Tesis maestría. Universidad de Taiwán. pp 56.

Ghorbani, R., Alemzadeh, A y Hooman, R (2019). Microarray analysis of transcriptional responses to salt and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Heliyon*, 5, e02614.

Gil, A. I y Miranda, D (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 217-222.

Giorno, F., Guerriero, G., Baric, S y Mariani, C (2012). Heat shock transcriptional factors in *Malus domestica*: identification, classification, and expression analysis. *BMC Genomics*, 13(1), 639.

Girón, A (2015). Caracterización y Análisis de Expresión en Respuesta a Estrés por Déficit Hídrico, de Genes Homólogos Tipo SHINE en papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 277.

- Gong, B., Yi, J., Wu, J., Sui, J., Khan, M. A., Wu, Z., Zhong, X., Seng, S., He, J y Yi, M. (2014). LIHSA1, a novel heat stress transcription factor in lily (*Lilium longiflorum*), can interact with LIHSA2 and enhance the thermotolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33(9), 1519–1533.
- González, D., Espadas y Gil, F., Santamaría, J.M y Zapata, O (2007). Multiple effects of cadmium on the photosynthetic apparatus of *Avicennia germinans* L. as probed by OJIP chlorophyll fluorescence measurements. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 62(3-4), 265-272.
- Goodman, H. M., Ecker, J. R y Dean, C (1995). The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 10831–10835.
- Granados, R., Salceda, R y Longar Del Pilar, M (2015). Situación actual y perspectivas tecnológicas para la papaya (*Carica papaya* L.) en el distrito de Veracruz, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(4), 749-761.
- Gray, S y Brady, S (2016). Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology*, 419(1), 64-77.
- Greer, D y Weedon, M (2012) Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. *Plant Cell and Environment*, 35(6):1050-1064.
- Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Wang, Y y Wang, J (2008). Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(2), 105–118.
- Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Luo, D. X., Gong, Z. H y Lu, M. H (2016). The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 114.

- Guo, M., Lu, J., Zhai, Y. Chai, W., Gong, Z y Lu, M (2015). Genome-wide analysis, expression profile of heat shock factor gene family (CaHSFs) and characterisation of CaHsfA2 in pepper (*Capsicum annuum* L.). *BMC Plant Biology*, 15, 151.
- Gutiérrez, D.F., Ruiz, R y Xoconostle, B (2015). Problemas que enfrentan la agricultura y el campo mexicano. Estado Actual de los Cultivos Genéticamente Modificados en México y su Contexto Internacional. México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 6-167.
- Hakim, A., Ullah, A., Hussain, A., Shaban, M., Khan, A., Alariqi, M., Gul, S., Jun, Z., Lin, S., Li, J., Jin, S y Munis, M.F (2018). Osmotin: a plant defense tool against biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 123, 149–159.
- Hall, T.A (1999). Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M., Roychowdhury, R y Fujita, M (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5), 9643-9684.
- Hatfield, J y Prueger, J (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4-10.
- Heerklotz, D., Döring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S y Nover, L (2001). The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1759-1768.
- Hong, Bo S., Zong Suo, L y Ming An, S (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4), 131-135.

- Horváth, I., Glatz, A., Nakamoto, H., Mishkind, M. L., Munnik, T., Saidi, Y y Vigh, L (2012). Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections. *Progress in Lipid Research*, 51(3), 208–220.
- Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A y Vigh, L (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1778 (7-8), 1653-1664.
- Howarth, C (2005). Genetic Improvements of Tolerance to High Temperature. In: Ashraf M and Harris P. (eds) *Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*: Food Products Press, New York, NY. pp. 725.
- Hsiang, L y Yee, C (2012). Acquired thermotolerance independent of heat shock factor A1 (HsfA1), the master regulator of the heat stress response. *Plant Signal Behav*, 7(5), 547–550.
- Hu, W., Hu, G y Han, B (2009). Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, 176(4), 583-590.
- Hu, X., Chen, D., Lynne McIntyre, C., Dreccer M. F., Zhang Z., Drenth J., Sundaravelpadian K., Chang H y Xue P. (2018). Heat shock factor C2a serves as a proactive mechanism for heat protection in developing grains in wheat via an ABA-mediated regulatory pathway. *Plant, Cell and Environment*. 41(1), 79-98.
- Hu, Y., Han, Y. T., Wei, W., Li, Y. J., Zhang, K., Gao, Y. R., Zhao, F.L y Feng, J. Y (2015). Identification, isolation, and expression analysis of heat shock transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 736.
- Hubl, S., Owens, J y Nelson, H (1994). Mutational analysis of the DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor. *Nature Structural and Molecular Biology*, 615–620.

- Huerta, J. Á., Osuna, J.A., Lino, G.J., Barrera, A., Mendoza, G., De León Rodríguez, A., y Barba de la Rosa A.P. (2012) Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2160-2169.
- Hull, J., Neufeld, H y Gilliam, F (2019). Plant Ecology, Encyclopedia of Ecology, 2019 pp: 528-548.
- Ikeda, M y Ohme, M (2009). A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 50(5), 970-975.
- Ikeda, M., Mitsuda, N y Ohme Takagi, M (2011). *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant Physiology*, 157(3), 1243-1254.
- Ilík, P., Špundová, M., Šicner, M., Melkovičová, H., Kučerová, Z., Krchňák, P., Fürst, T., Večeřová, K., Panzarová, K., Benediktyová, Z y Trtílek, M (2018). Estimating heat tolerance of plants by ion leakage: a new method based on gradual heating. *New Phytologist*, 218(3), 1278-1287.
- Imai, K y Murata, O (1982). Photosynthesis and respiration of papaya (*Carica papaya* L.) leaves. *Acta CEcologica*, 3(17), 399-407.
- Inukai, S., Kock, K y Bulyk, M (2017). Transcription factor–DNA binding: beyond binding site motifs. *Current Opinion in Genetics and Development*, 43, 110-119.
- ITIS (2020). Sistema Integrado de Información Taxonómica. *Carica papaya* L. Caricaceae Taxonomic Serial No. 22324. [on line] (Actualizado 17 enero 2020)
Disponible en: <http://www.itis.gov/>
.....[Acceso agosto 2018].

- IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. pp. 104.
- Ismail, A y Hall, A (1999). Reproductive-Stage Heat Tolerance, Leaf Membrane Thermostability and Plant Morphology in Cowpea. *Crop Science*, 39 (6), 1762-1768.
- Jacob, P., Hirt, H y Bendahmane, A (2016). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 405–414.
- Jaleel, C., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, J., Somasundaram, R y Panneerselvam, R (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 100-105.
- Jedrowski, C y Brüggemann, W (2015). Imaging of fast chlorophyll fluorescence induction curve (OJIP) parameters applied in a screening study with wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes under heat stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 151, 153–160.
- Jeyakumar, P., Kavino, M., Kumar, N y Soorianathasundaram, K (2007). Physiological performance of papaya cultivars under abiotic stress conditions. *Acta Horticulturae*, (740), 209–215.
- Jiang, Y y Huang, B (2000). Effects of Drought or Heat Stress Alone and in Combination on Kentucky Bluegrass. *Crop Science*, 40(5), 1358.
- Jiménez, J (2002). Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaina. Guácimo, Costa Rica. Earth. pp. 108.

- Jiménez, S., Álvaro S.O y Balaguera, H (2015). Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus*; L. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 149.
- Jiménez, S., Álvaro S.O y Balaguera, H (2015). Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus*; L. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 149.
- Jiménez, V., Mora Newcomer, E y Gutiérrez Soto, M.V. (2014). Biology of the Papaya Plant. In: Ming R., Moore P. (eds) Genetics and Genomics of Papaya. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, vol 10. Springer, New York, NY. pp. 17-33.
- Jiménez, V.M., Mora Newcomer, E y Gutiérrez Soto, M.V (2014). Biology of the Papaya Plant. In: Ming R., Moore P. (eds) Genetics and Genomics of Papaya. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, vol 10. Springer, New York, NY. pp. 17-33.
- Jin, G., Gho, H y Jung, K (2013). A systematic view of rice heat shock transcription factor family using phylogenomic analysis. *Molecular Biology*, 170(3), 321-329.
- Jones, M.M y Rawson, H.M (1979). Influence of Rate of Development of Leaf Water Deficits upon Photosynthesis, Leaf Conductance, Water Use Efficiency, and Osmotic Potential in Sorghum. *Physiologia Plantarum*, 45(1), 103–111.
- Jumiatun, A., Junaedi, I., Lubis, M.A., Chozin y A. Miyazaki (2016). Morphological, Physiological and Yield Responses of Some Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) as Exposed Under High Temperature in Indonesia, *American Journal of Plant Physiology*, 11 (1) pp: 33-41.
- Kadioglu, A y Terzi, R (2007). A dehydration avoidance mechanism: Leaf rolling. *The Botanical Review*, 73(4), 290-302.

- Kalaji, H. M., Carpentier, R., Allakhverdiev, S. I y Bosa, K (2012). Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 112, 1–6.
- Kalaji, H., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I., Cetner, M., Lukasik, I., Goltsev, V y Ladle, R (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (4), 102.
- Kari du Plessis (2017). The evaluation of the impact of microclimatic factors on grapevine berries in a vineyard setting through molecular profiling. Doctoral thesis. Institute for Wine Biotechnology, Faculty of AgriSciences. Stellenbosch University. pp. 243.
- Khan, S., Anwar, S., Ashraf, M., Khaliq, B., Sun, M., Hussain, S., Zhi qiang, G., Hafeez, N y Sher, A (2019). Mechanisms and Adaptation Strategies to Improve Heat Tolerance in Rice. A Review. *Plants*, 8(11), 508.
- Khedher, M y Ewing, E (1985). Growth analyses of eleven potato cultivars grown in the greenhouse under long photoperiods with and without heat stress. *American Potato Journal*, 62(10): 537-554.
- Kijne, J (2006). Abiotic stress and water scarcity: Identifying and resolving conflicts from plant level to global level. *Field Crops Research*, 97(1), 3-18.
- Kim, M.S., Moore, P.H., Zee, F., Fitch, M.M., Steiger, D.L., Manshardt, R.M., Paull, R.E., Drew R.A., Sekioka T y Ming, R. (2002). Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, 45 (3), 503-512.
- Körner, C (2006). Plant CO₂ responses: an issue of definition, time, and resource supply. *New Phytologist*, 172(3), 393-411.

- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E y Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310-316.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E y Scharf, K. D (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310-316.
- Kotak, S., Port, M., Ganguli, A., Bicker, F y Von Koskull-Döring P (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. *The Plant Journal*, 39 (1), 98-112.
- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortés, D., Shulaev, V y Mittler, R (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *The Journal of biological chemistry*, 283(49): 34197-203.
- Kreslavski, V., Carpentier, R., Klimov, V., Murata, N y Allakhverdiev, S (2007). Molecular mechanisms of stress resistance of the photosynthetic apparatus, *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 1(3), 185-205.
- Kuczyńska, A., Cardenia, V., Ogrodowicz, P., Kempa, M., Rodriguez, M y Mikołajczak, K (2019). Effects of multiple abiotic stresses on lipids and sterols profile in barley leaves (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 215-224.
- Kumar, A.J., Amaregouda, A., Mahantashivayogayya, K y RP Patil (2018). Effect of high temperature studies on morphological traits of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for temperature tolerance. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 428-432.

- Kumar, M., Busch, W., Birke, H., Kemmerling, B., Nurnberger, T y Schoffl, F (2009). Heat Shock Factors HsfB1 and HsfB2b Are Involved in the Regulation of Pdf1.2 Expression and Pathogen Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2(1),152–165.
- Kumar, S., Stecher, G y Tamura, K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A y Trtílek, M (2019). Analysis of OJIP Chlorophyll Fluorescence Kinetics and QA Reoxidation Kinetics by Direct Fast Imaging. *Plant Physiology*, 179(2), 369-38.
- La gra, J (1993). Una metodología de evaluación de cadenas agroalimenticias para la identificación de problemas y proyectos (MECA). Instituto para la Postcosecha de productos Perecederos, Moscow, Idaho. pp. 237.
- Lambers, H., Chapin, FS y Pons, TL (2008). Plant Water Relations, in: Plant physiological ecology, 2nd edn. Springer, New York. pp. 163-223.
- Lepedus, H., Brkic, I., Vera C., Jurkovi, V., Antunovi, J., Jambrovi, A., Brki, J y Domagoj, S (2012). Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum*, 114(1), 73–76.
- Letunic, I y Bork, P (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 8(44), 242-245.
- Li C., Chen Q., Gao X., Qi B., Chen N., Xu S., Chen, J y Wang, X (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.

- Li, M., Berendzen, K.W y Schöff, F (2010). Promoter specificity and interactions between early and late *Arabidopsis* heat shock factors. *Plant Molecular Biology*, 73, 559–567.
- Li, M., Doll, J., Weckermann, K., Oecking, C., Berendzen, K. W y Schöffl, F. (2010). Detection of in vivo interactions between *Arabidopsis* class A-HSFs, using a novel BiFC fragment, and identification of novel class B-HSF interacting proteins. *European Journal of Cell Biology*, 89(2-3), 126–132.
- Li, P.S., Yu, T.F., He, G.H., Chen, M., Zhou, Y.B., Chai, S.C., Xu, Z.S y Ma, Y.Z. (2014). Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. *BMC Genomics*, 15, 1009.
- Li, Z.Q., Xing, W., Luo, P., Zhang, F. J., Jin, X. L., y Zhang, M. H (2019). Comparative transcriptome analysis of *Rosa chinensis* “Slater”s crimson China’ provides insights into the crucial factors and signaling pathways in heat stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 312–331.
- Liao, W., Lin, L., Jheng, J., Wang, C., Yang, J y Chou, M (2016). Identification of Heat Shock Transcription Factor Genes Involved in Thermotolerance of Octoploid Cultivated Strawberry. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2130.
- Lin, Y., Jiang, H., Chu, Z., Tang, X., Zhu, S y Cheng, B (2011). Genome-wide identification, classification, and analysis of heat shock transcription factor family in maize. *BMC Genomics*, 12 (1), 76.
- Liu, A.L, Zou, J, Zhang, X.W, Zhou, X.Y, Wang, W.F, Xiong, X.Y, Chen, L.Y y Chen, X.B (2010). Expression profiles of class a rice heat shock transcription factor gene under abiotic stresses. *Journal of Plant Biology*, 53, 142–149.
- Liu, G., Chai, F., Wang, Y., Jiang, J., Duan, W., Wang, Y., Wang, F., Li, S y Wang, L (2018). Genome-wide Identification and Classification of HSF Family in Grape, and Their Transcriptional Analysis under Heat Acclimation and Heat Stress. *Horticultural Plant Journal*, 4(4), 133-143.

- Liu, H y Charng, Y (2012) Acquired thermotolerance independent of heat shock factor A1 (HsfA1), the master regulator of the heat stress response. *Plant Signalling and Behaviour*, 7(5), 547–550.
- Liu, H., Liao, H y Charng, Y (2011). The role of class A1 heat shock factors (HsfA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment*, 34(5), 738-751.
- Lloyd, J y Farquhar, G (2008). Effects of rising temperatures and [CO₂] on the physiology of tropical forest trees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1498), 1811-1817.
- Loehle, C. (1995). Anomalous Responses of Plants to CO₂ Enrichment. *Oikos*, 73(2), 181.
- Lohmann, C., Eggers, G., Wunderlich, M y Schöffl, F (2004). Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1), 11-21.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S y Shafee, T (2017). Transcriptomics Technologies. *Plos Computational Biology*, 13(5), e1005457.
- Lu, S., Guo, Z y Peng, X (2003). Effects of ABA and S-3307 on drought resistance and antioxidative enzyme activity of turfgrass. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78, 663- 666.
- Lyck, R., Harmening, U., Höfeld, I., Treuter, E., Scharf, K.D y Nover, L (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta*, 202(1), 117–125.
- Magnard, J., Vergne, P y Dumas, C (1996). Complexity and Genetic Variability of Heat-Shock Protein Expression in Isolated Maize Microspores. *Plant physiology*, 111(4), 1085-1096.

- Mahouachi, J., Socorro, A y Talon, M (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance, *Plant and Soil*, 281, 137-146.
- Malumpong, C., Cheabu, S., Mongkolsiriwatana, C., Detpittayanan, W y Vanavichit, A. (2019). Spikelet fertility and heat shock transcription factor (Hsf) gene responses to heat stress in tolerant and susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *The Journal of Agricultural Science*, 1–17.
- Mao, X., Zhang, H., Qian, X., Li, A., Zhao, G y Jing, R (2012). TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 63 (8), 2933-2946.
- Martinazzo, E., Ramm, A y Bacarin, M (2013). The chlorophyll a fluorescence as an indicator of the temperature stress in the leaves of *Prunus pérsica*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24(4), 237-246.
- Maseyk, K., Lin, T., Cochavi, A., Schwartz, A y Yakir, D (2019). Quantification of leaf-scale light energy allocation and photoprotection processes in a Mediterranean pine forest under extensive seasonal drought. *Tree Physiology*, 39(10), 1767-1782.
- Mathur, S., Agrawal, D y Jajoo, A (2014). Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 137, 116–126.
- Mathur, S., Jajoo, A., Mehta, P y Bharti, S (2010). Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Biology*, 13(1), 1–6.
- Meher, P., Shivakrishna, P., Ashok, R.K y Manohar R.D (2018). Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 285-289.

- Miller, G y Mittler, R (2006). Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? *Annals of Botany*, 98(2), 279–288.
- Ming, R.R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., J.H. Saw, P. Senin, W. Wang, B.V. Ly, K.L.T. Lewis, S.L. Salzberg, L. Feng, M.R. Jones, R.L. Skelton, Jan E. . Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R.E. Paull, T.P. Michael, K. Wall, D.W. Rice, H. Albert, M. Wang, Y.J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R.A. Acob, P. Guan, A. Blas, C. Man Wai, C.M. Ackerman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J. Na, E.V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J.E. Bowers, A.R. Gschwend, A.L. Delcher, R. Singh, J.Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M.J. Torres, F.A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A.M. Burroughs, M. Luo, L. Liu, D.A. Christopher, S.M. Mount, P.H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M.A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D.E. Shippen, C.W. de Pamphilis, J.D. Palmer, M. Freeling, A.H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang y M. Alam, T (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452, 991-997.
- Mishra, S., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L y Scharf, KD (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes and Development*, 16(12), 1555-1567.
- Mittal, D., Chakrabarti, S., Sarkar, A., Singh, A y Grover, A (2009). Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature, and oxidative stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47(9), 785-795.
- Mittler, R (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15-19.

- Mlinarić, S., Antunović, J., Skendrović, M., Cesar, V y Lepeduš, H (2017). Differential accumulation of photosynthetic proteins regulates diurnal photochemical adjustments of PSII in common fig (*Ficus carica* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 209, 1–10.
- Mohammed, A y Tarpley, L (2010). Effects of high night temperature and spikelet position on yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants, *European Journal of Agronomy*, 33(2), 117-123.
- Morison, J., Baker, N., Mullineaux, P y Davies, W (2008). Improving water use in crop production. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1491), 639-658.
- Mudrik, V., Kosobrukhov, A., Knyazeva, I y Pigulevskaya, T (2003). Changes in the photosynthetic characteristics of *Plantago* major plants caused by soil drought stress. *Plant Growth Regulation*, 40(1), 1-6.
- Muñozcano, M. y C.O. Martínez (2008). Paquete tecnológico para la producción de papaya en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa, A.C. pp.1-13.
- Nakai, A y Ishikawa, T (2000). A nuclear localization signal is essential for stress-induced dimer-to-trimer transition of heat shock transcription factor 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34665-71.
- Nakai, K., Horton, P., Nakai, K y Horton, P (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 34-36.
- Nakashima, K., Ito, Y y Yamaguchi, K (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant physiology*, 149(1), 88-95.

- Nankishore, A y Farrell, A. D (2016). The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 202, 75–82.
- Neta, I., Isaacson, T., Lurie, S y Weiss, D (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell*, 17, 1829–1838.
- Neta, I., Isaacson, T., Lurie, S y Weiss, D (2005). Role for Tomato Heat Shock Protein 21: Protecting Photosystem II from Oxidative Stress and Promoting Color Changes during Fruit Maturation. *The Plant Cell*, 17(6), 1829-1838.
- Niembro, A (1988). Semillas de árboles y arbustos: ontogenia y estructura. Limusa, México. pp. 285.
- Nievola, C., Carvalho, C., Carvalho, V y Rodrigues, E (2017). Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature*, 4(4), 371-405.
- Nishizawa, A., Nosaka, R., Hayashi, H., Tainaka, H., Maruta, T., Tamoi, M., Ikeda, M., Ohme-Takagi, M., Yoshimura, K., Yabuta, Y y Shigeoka, S (2011). HsfA1d and HsfA1e Involved in the Transcriptional Regulation of HsfA2 Function as Key Regulators for the Hsf Signaling Network in Response to Environmental Stress. *Plant and Cell Physiology*, 52(5), 933-945.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y y Shigeoka, S (2008). Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiology*, 147,1251-1263.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K y Shigeoka, S (2006). *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *The Plant Journal*, 48(4), 535-547.
- Niu, Y y Xiang, Y (2018). An Overview of Biomembrane Functions in Plant Responses to High-Temperature Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 915.

- Nonami, H y Schulze, E.D (1989). Cell water potential, osmotic potential, and turgor in the epidermis and mesophyll of transpiring leaves. *Planta*, 177(1), 35–46.
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S., Ganguli, A y Scharf, KD (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress and Chaperones*, 6 (3), 177-189.
- Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., Verner, E.C y Gurley, W.B (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress and Chaperones*, 1(4), 215-223.
- Ogawa, D., Yamaguchi, K y Nishiuchi, T (2007). High level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3373-3383.
- Ogawa, D., Yamaguchi, K y Nishiuchi, T (2007). High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3373-3383.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K y Yamaguchi Shinozaki, K (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science*, 22(1), 53-65.
- Okunlola, G.O y Adelusi, A.A (2013). Effect of Prior Heat Stress on the Early Growth of *Carica papaya*. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(4), 508-512.
- Osório, M.L., Osório, J., Vieira, A.C., Gonçalves, S y Romano, A (2011). Influence of enhanced temperature on photosynthesis, photooxidative damage, and antioxidant strategies in *Ceratonia siliqua* L. seedlings subjected to water deficit and rewatering. *Photosynthetica*, 49, 3–12.

- Paixão, J., Da Silva, J., Ruas, K., Rodrigues, W., Filho, J., Bernardo, W., Abreu, D., Ferreira, L., Gonzalez, J., Griffin, K., Ramalha, J y Campostrini, E (2019). Photosynthetic capacity, leaf respiration and growth in two papaya (*Carica papaya*) genotypes with different leaf chlorophyll concentrations. *AoB Plants*, 11(2), plz013.
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V y Senthil-Kumar, M (2017). Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 537.
- Pandey, P., Ramegowda, V y Senthil Kumar, M (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 6, 723.
- Paull, R (1995). Preharvest factors and the heat sensitivity of field-grown ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), 167-175.
- Paull, R., Nishijima, W., Reyes, M y Cavaletto, C (1997). Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 165-179.
- Pereyra, C. M y Quiriban, A (2014). Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. *Semiárida Revista de la Facultad de Agronomía UNLPPam*, 24(1), 55-67.
- Peteranderl, R., Rabenstein, M., Shin, Y.K., Liu, C.W., Wemmer, D.E., King, D. S y Nelson, H. C (1999). Biochemical and Biophysical Characterization of the Trimerization Domain from the Heat Shock Transcription Factor. *Biochemistry*, 38(12), 3559–3569.
- Pirasteh, H., Saed, A., Pakniyat, H y Pessarakli, M (2016). Stomatal responses to drought stress, en: *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach*, Wiley Blackwell (ed). Oxford, UK. pp. 24-40.

- Posada, L., Gómez, R., Pérez, J., Reyes, M y Montenegro, O (2010). Development of a new papaya (*Carica papaya* L.) Hybrid IBP. *Interciencia*. 35(6), 461-465.
- Poudyal, D., Rosenqvist, E., y Ottosen, C.O (2018). Phenotyping from lab to field tomato lines screened for heat stress using Fv/Fm maintain high fruit yield during thermal stress in the field. *Functional Plant Biology*, 46(1) 44-55.
- Plan Estatal de Desarrollo Yucatán. 2012-2018. [Online] (Actualizado 02 de mayo 2018) Disponible en: <http://www.yucatan.gob.mx/gobierno/ped.php.ies.html> [Acceso 21 marzo 2018].
- Prasad, P., Staggenborg, S y Ristic, Z (2008). Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants, en: Response of Crops to Limited Water: Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes, Ahuja, L.H., Saseendran, S.A., Eds.; Advances in Agricultural Systems Modeling Series 1; ASA-CSSA: Madison, WI, USA. pp. 301-355.
- Prasad, P.V., Pisipati, S.R., Momčilović, I y Ristic, Z (2011). Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(6), 430–441.
- Prasad, P.V., Staggenborg, S.A y Ristic, Z (2008). Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants. L.R. Ahuja, V.R. Reddy, S.A. Saseendran and Qiang Yu (ed.). Response of Crops to Limited Water: Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes. American Society of Agronomy. Crop Science Society of America. Soil Science Society of America. pp. 301-355.
- Priya, M., Dhanker, O. P., Siddique, K. H. M., HanumanthaRao, B., Nair, R. M., Pandey, S., Sadhana, S, Varshney, R, Prasad V y Nayyar, H (2019). Drought and heat stress-

- related proteins: an update about their functional relevance in imparting stress tolerance in agricultural crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(6), 1607–1638.
- Qiao, X., Li, M., Li, L., Yin, H., Wu, J y Shaoling, Z (2015). Genome-wide identification and comparative analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and five other Rosaceae species. *BMC Plant Biology*, 15, 12.
- Rai, A.N., Saini, N., Yadav, R y Suprasanna, P (2020). A potential seedling-stage evaluation method for heat tolerance in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss). *3 Biotech*, 10(3), 114.
- Raja, V., Qadir, S., Alyemeni, M y Ahmad, P (2020). Impact of drought and heat stress individually and in combination on physio-biochemical parameters, antioxidant responses, and gene expression in *Solanum lycopersicum*. *3 Biotech*, 10(5), 208.
- Remans, T., Keunen, E., Bex, GJ., Smeets, K., Vangronsveld, J y Cuypers, A (2014). Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell*, 26(10), 3829-37.
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., Hong, X., Zhu, J y Gong, Z (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 63(3), 417-429.
- Riaño, D.M., Ruzicic, S., Dreyer, I y B. Mueller, B (2007). PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database, *BMC Bioinformatics*, 8, 42.
- Richter, K., Haslbeck, M y Buchner, J (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2), 253-266.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z.,

- Ghandehari, D., Sherman, B.K y Yu, G (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105-2110.
- Riffo, C (5 de marzo 2018). Alerta entre agricultores por baja producción de papayas en La Serena, La tercera. En: <https://www.latercera.com/noticia/alerta-agricultores-baja-produccion-papayas-la-serena/>.
- Rizhsky, L., Hongjian, L y Mittler, R (2002). The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology*, 130(3), 1143-51.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S y Mittler, R (2004) When Defense Pathways Collide. The Response of *Arabidopsis* to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*, 134, 1683–1696.
- Rodell, M., Famiglietti, J., Wiese, D., Reager, J., Beaudoin, H., Landerer, F y Lo, M (2018). Emerging trends in global freshwater availability. *Nature*, 557(7707), 651-659.
- Rollins, J.A., Habte, E., Templer, S.E., Colby, T., Schmidt, J y von Korff, M (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3201–3212.
- Romero, G. (2018). Caracterización fisiológica y Análisis del perfil de proteínas en plantas de *Carica papaya* L. tolerantes y susceptibles sometidas a estrés hídrico. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 247.
- Roth, I y Clausnitzer, I (1972). Desarrollo y Anatomía del fruto y de la semilla de *Carica papaya* L. (Lechosa). *Acta Botánica Venezolánica*, 7(1), 187-206.
- Ruiz, C., J.A., G. Medina, G., I. J. González, A., H.E. Flores, L., G. Ramírez, O., C. Ortiz, T., K.F. Byerly, M. y R.A. Martínez, P (2013). Requerimientos agroecológicos de cultivos. Segunda Edición. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP. Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias-CIRPAC-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. pp. 564.

Sanabría, A.K y Lazo, R.H (2018). Aclimatación a la alta temperatura y tolerancia al calor (TL50) en 6 variedades de *Chenopodium quinua*. *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 147-152.

Sánchez, J., Pérez, P y Martínez, R (2002). Photosynthesis, carbohydrate levels and chlorophyll fluorescence-estimated intercellular CO₂ in water-stressed *Casuarina equisetifolia* Forst. *Plant, Cell and Environment*, 22(7), 867-873.

Sánchez, M y Aguirreolea, J (2008). El agua en la planta. Movimiento del agua en el sistema suelo-planta-atmósfera, en: Fundamentos de fisiología vegetal, Azcón, B.J., Talón M (ed). McGraw-Hill Interamericana. pp. 25-40.

Santoro, M (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 55-63.

Santos, M., Ribeiro, R., Machado, E y Pimentel, C (2009). Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under mild water deficit. *Biologia Plantarum*, 53(2), 229-236.

Sarker, U y Oba, S (2018). Drought Stress Effects on Growth, ROS Markers, Compatible Solutes, Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity in *Amaranthus tricolor*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 186, 999–1016.

Sasi, S., Venkatesh, J., Daneshi, R y Gururani, M (2018). Photosystem II Extrinsic Proteins and Their Putative Role in Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants. *Plants*, 7(4), 100.

Scharf, K., Berberich, T., Ebersberger, I y Nover, L (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function, and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 104-119.

- Scharf, K., Berberich, T., Ebersberger, I y Nover, L (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function, and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (2), 104-119.
- Scharf, K., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E y Nover, L (1998). Needs Interaction with HsfA1 for Efficient Nuclear Import and May Be Localized in Cytoplasmic Heat Stress Granules. *Molecular and Cellular Biology*, 18 (4), 2240.
- Scharf, K.D., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E y Nover, L (1998). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 2240-2251.
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., Englich, G., Walch, D y Döring, P (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 Molecular Biology*, 60(5), 759-772.
- Scott, A., Samantha, L., Ryan, J., Baylis, D., William, H., Lee, C y Dawn, S (2002). In vivo evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress. *Functional Plant Biology*, 29(8), 935–946.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2019. Panorama Agroalimentario 2019 [On line] (Actualizado 3 de febrero 2019)
Disponibile en: <https://www.gob.mx/siap/>.
[Acceso 15 mayo 2020].
- Servicio Nacional de sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, [Online] (actualizado 14 septiembre 2017).
Disponibile en: www.senasica.gob.mx
[Acceso 10 febrero 2019].

Sistema Integrado de Información Taxonómica, 2018. *Carica papaya* L. Caricaceae
Taxonomic Serial No. 22324. [On line] (Actualizado 08 noviembre 2018).

Disponible en: <http://www.itis.gov/>

[Acceso 15 de abril 2019].

Shah, Z., Shah, S., Ali, G., Munir, I., Khan, R., Lqbal, A., Ahmed, N y Jan, A (2020).
Introduction of *Arabidopsis*'s heat shock factor HsfA1d mitigates adverse effects of
heat stress on potato (*Solanum tuberosum* L.) plant. *Cell Stress and Chaperones*,
25(1), 57-63.

Sharma, D.K., Andersen, S. B., Ottosen, C.O y Rosenqvist, E (2015). Wheat cultivars
selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total
chlorophyll, stomatal conductance, transpiration, and dry matter. *Physiologia
Plantarum*, 153(2), 284–298.

Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F.,
Stephan de Groot., Soole, K y Langridge, P (2017). Early Flowering as a Drought
escape Mechanism in Plants: How Can It Aid Wheat Production? *Frontiers in plant
science*, 8, 1950.

Shijini, E.M. (2010). Response of papaya to organic manures, plant growth promoting
microorganisms and mulching. Master thesis. Department of pomology and
floriculture. Kerala. India. pp 184.

Shinozaki, K y Yamaguchi, K (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-
Stress Response. *Plant Physiology*, 115(2), 327-334.

Singh, K., Foley, R y Oñate, L (2002). Transcription factors in plant defense and stress
responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), 430-436.

- Sinsawat, V., Leipner, J., Stamp, P y Fracheboud, Y (2004). Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 123–129.
- Sintayehu, D (2018). Impact of climate change on biodiversity and associated key ecosystem services in Africa: a systematic review. *Ecosystem Health and Sustainability*, 4(9), 225-239.
- Soliman, W., Fujimori, M., Tase, K y Sugiyama, S (2011). Oxidative stress and physiological damage under prolonged heat stress in C3 grass *Lolium perenne*. *Grassland Science*, 57(2), 101-106.
- Song, Q., Yang, F., Cui, B., LI, J., Zhang, Y., Li, H., Qiu, N., Wang, F y Gao, J (2019). Physiological and molecular responses of two Chinese cabbage genotypes to heat stress. *Biologia Plantarum*, 63 (1), 548-555.
- Stirbet, A y Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2), 236-257.
- Storey, W.B (1985). *Carica papaya*. In: CRC Handbook of flowering, Abraham H. Halevy. (ed). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. pp. 147-157.
- Strasser, A., Srivastava, A y Tsimilli Michael, M (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, en: Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation, Yunus, M., Pathre, U y Mohanty, P (eds). Taylor and Francis, London, UK, pp. 445-483.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E y Mittler, R (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.

- Swindell, W., Huebner, M y Weber, A (2007). Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8(1), 125.
- Taiz, L. y E. Zeiger (2003). Plant physiology. Sinauer Associates, Inc. Four Edition. pp.690.
- Tang, R., Zhu, W., Song, X., Lin, X., Cai, J., Wang, M y Yang, Q (2016). Genome-Wide Identification and Function Analyses of Heat Shock Transcription Factors in Potato. *Frontiers in Plant Science*, 7, 490.
- Tarora, K., Tamaki, M., Shudo, A., Urasaki, N., Matsumura, H y Adaniya, S (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 Tissue and Organ Culture*, 102, 69-77.
- Tolosa, L y Zhang, Z (2020). The Role of Major Transcription Factors in Solanaceous Food Crops under Different Stress Conditions: Current and Future Perspectives. *Plants*, 9(1), 56.
- Török, Z., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N., Glatz, N., Balogh, G., Varvasovszki, V., Dmitry, A., Vierling, E., Crowe, J y László, V (2001). *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3098-3103.
- Urban, J., Ingwers, M., McGuire, M y Teskey, R (2017). Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signaling and Behavior*, 12(8), e1356534.
- Van, P., Swanepoel, J y Krüger, G (2007). Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO₂ assimilation. *Environmental and Experimental Botany*, 61(2), 124-136.

- Vázquez, E., Mata, H., Ariza, R y Santamaría, F (2010). Producción y manejo postcosecha de papaya maradol en la planicie Huasteca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Villa Cuahémoc, Tamaulipas. pp. 138.
- Vincent, C., Rowland, D. L y Schaffer, B (2015). The potential for primed acclimation in papaya (*Carica papaya* L.): Determination of critical water deficit thresholds and physiological response variables. *Scientia Horticulturae*, 194, 344–352.
- Von Heijne, G (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research*, 14(11), 4683-4690.
- Von Koskull Döring, P., Scharf, K. D y Nover, L (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science*, 12(10), 452–457.
- Wahid, A (2007). Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of Plant Research*.120:219-228.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M y Foolad, M (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199–223.
- Wan, X., Yang, J., Guo, C., Bao, M y Zhang, J (2019). Genome-wide identification and classification of the Hsf and sHsp gene families in *Prunus mume*, and transcriptional analysis under heat stress. *PeerJ*, e7312.
- Wang, C., Deng, P., Chen, L., Wang, X., Ma, H., Hu, W., Yao, N., Feng, Y., Chai, R., Yang, G y He, G (2013). A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco. *PLoS One*, 8(6), e65120.
- Wang, G., Tian, F., Zhang, M y Wang, W (2014). The overaccumulation of glycinebetaine alleviated damages to PSII of wheat flag leaves under drought and high temperature stress combination. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2743-2753.

- Wang, G.P., Zhang, X.Y., Li, F., Luo, Y y Wang, W (2010). Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. *Photosynthetica*, 48(1), 117-126.
- Wang, J y Chameides, B (2007). Are Humans Responsible for Global Warming: A Review of the facts. *Environmental Defense*, 2-6.
- Wang, P., Song, H., Li, C., Li, P., Li, A., Guan, H., Hou, L y Wang, X (2017). Genome-Wide Dissection of the Heat Shock Transcription Factor Family Genes in *Arachis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 106.
- Wang, W., Vinocur, B y Altman, A (2003). Plant responses to drought, salinity, and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, X., Huang, W., Yang, Z., Liu, J y Huang, B (2016). Transcriptional regulation of heat shock proteins and ascorbate peroxidase by CtHsfA2b from African bermudagrass conferring heat tolerance in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 6, 28021.
- Wang, Y., Cai, S., Yin, L., Shi, K., Xia, X., Zhou Y., Yu, J y Zhou, J (2015). Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating ATG genes and inducing autophagy. *Autophagy*, 11(11), 2033-2047.
- Wasaya, A., Zhang, X., Fang, Q y Yan, Z (2018). Root phenotyping for drought tolerance: a review. *Agronomy*, 8(2018), 241.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R y Schwede, T (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303.
- Wolf, J (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13, 559-572.

- Wu, C (1995). Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation. *Annual Review Cell of Developmental Biology*, 11, 441-69.
- Wu, H.Y., Shou, S.Y., Zhu, Z.J y Yang, X.T (2001). Effects of high temperature stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sweet pepper (*Capsicum frutescens* L.). *Acta Horticulturae Sinica*, 28(6), 517-521.
- Wu, Q.S., Xia, R.X y Zou, Y.N (2008). Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*, 44, 122–128.
- Xiang, J., Ran, J., Zou, J., Zhou, X., Liu, A., Zhang, X., Peng, Y., Tang, N., Luo, G y Chen, X (2013). Heat shock factor OsHsfB2b negatively regulates drought and salt tolerance in rice. *Plant Cell Reports*, 32, 1795–1806.
- Xu, Z y Zhou, G (2006). Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224, 1080–1090.
- Xue, G., Sadat, S., Drenth, J y McIntyre, C (2014). The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 539-557.
- Yan, K., Chen, P., Shao, H., Zhang, L y Xu, G (2011). Effects of Short-Term High Temperature on Photosynthesis and Photosystem II Performance in Sorghum. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(5), 400–408.
- Yi, X., Zhang, Y., Yao, H., Luo, H., Gou, L., Chow, W y Zhang, W (2016). Rapid recovery of photosynthetic rate following soil water deficit and re-watering in cotton plants (*Gossypium herbaceum* L.) is related to the stability of the photosystems. *Journal of Plant Physiology*, 194, 23–34.

- Yokotani, N., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., Hirochika, H., Iwabuchi, M y Oda, K (2008). Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 227(5), 957-967.
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J. Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöfl, F., Shinozaki, K y Shinozakiy, K (2011). *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics*, 286, 321–332.
- Yu, H., Yang, X., Chen, S., Wang, Y., Li, J., Shen, Q., Liu, X y Guo, F (2012). Downregulation of chloroplast RPS1 negatively modulates nuclear heat-responsive expression of HsfA2 and its target genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 8, e1002669.
- Yue, N y Xiang, Y (2018). An Overview of Biomembrane Functions in Plant Responses to High-Temperature Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 915.
- Zamarud, S., Safdar, H., Asad, J y Gul, S (2017). Overexpression of the Heat Shock-Specific Transcription Factor HsfA1d Enhances Thermotolerance in Tobacco Plants. *Sarhad Journal of Agriculture*, 33,162-170.
- Zandalinas, S., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V y Gómez, A (2017). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162(1), 2-12.
- Zgallai, H., Steppe, K., y Lemeur, R (2005). Photosynthetic, Physiological and Biochemical Responses of Tomato Plants to Polyethylene Glycol-Induced Water Deficit. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(12), 1470–1478.

- Zha, Q., Xi, X., Jiang, A., Wang, S y Tian, Y (2016). Changes in the protective mechanism of photosystem II and molecular regulation in response to high temperature stress in grapevines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 43–53.
- Zhang, G., Chen, L., Zhang, S., Xiao, Y., He, Z y Lie, D (2005). Effect of high temperature stress on protective enzyme activities and membrane permeability of flag leaf in rice, 32(9),1306-1310.
- Zhang, J., Liu, B., Li, J., Zhang, L., Wang, Y., Zheng, H., Lu, M y Chen, J (2015).Hsf and Hsp gene families in Populus: genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses. *BMC Genomics*, 16 (1), 181.
- Zhou, R., Yu, X., Kjær, K., Rosenqvist, E., Ottosen, C y Wu, Z (2015). Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using Fv/Fm to reveal the physiological mechanism of heat tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 118, 1-11.
- Zhou, R., Yu, X., Ottosen, C.O., Rosenqvist, E., Zhao, L., Wang, Y., Yu, W., Zhao, T y Wu, Z (2017). Drought stress had a predominant effect overheat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biology*, 17, 24.
- Zhu, X., Huang, C., Zhang, L., Liu, H., Yu, J., Huy, Z y Hua, W (2017). Systematic Analysis of Hsf Family Genes in the Brassica napus Genome Reveals Novel Responses to Heat, Drought and High CO₂ Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1174.
- Zhu, X., Sun, L., Kuppu, S., Hu, R., Mishra, N., Smith, J., Esmaili, N.,Herath, M., Gore, M., Payton, P., Shen, G y Zhang, H. (2018) The yield difference between wild-type cotton and transgenic cotton that expresses IPT depends on when water-deficit stress is applied. *Scientific Reports*, 8(1), 2538.
- Zimarino V., Tsai, C y Wu, C (1990). Complex modes of heat shock factor activation. *Molecular and Cellular Biology*, 10(2), 752-759.

Živčák, M., Brestič, K y Olšovská, P (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil Environment*, 54(4), 133–139.

Era como un nuevo mundo abierto para mí, el mundo de la ciencia, que por fin se me permitió conocer en toda libertad.

Marie Curie