



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

Caracterización fisiológica y análisis de la expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* de *Carica papaya* cv Maradol y silvestre en respuesta a estrés por alta temperatura

Tesis que presenta
TIFFANY YISELLE CEVALLOS VILATUÑA
En opción al título de
MAESTRA EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México
2023



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Tiffany Yiselle Cevallos Vilatuña** titulado “**Caracterización fisiológica y análisis de la expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* de *Carica papaya* cv Maradol y silvestre en respuesta a estrés por alta temperatura**”, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de agrobiotecnología, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 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.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región debido a que, eventualmente, los conocimientos desarrollados en esta tesis tendrán impacto en los productores locales de papaya que enfrentan las consecuencias del cambio climático.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 07 de agosto de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 black ink, reading "Tiffany Cevallos V", written over a horizontal line.

Tiffany Yiselle Cevallos Vilatuña

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Biología** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Estudio bioinformático del proceso de domesticación de *Carica papaya* y el papel de factores de transcripción involucrados en su respuesta a cambio climático”, No. 320373, aprobado en el marco de la Convocatoria de Ciencia de Frontera, Modalidad: Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022 bajo la dirección del **Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández**.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para mi formación como Maestra en Ciencias Biológicas, con número de CVU: 1150026.

Al proyecto “Estudio bioinformático del proceso de domesticación de *Carica papaya* y el papel de factores de transcripción involucrados en su respuesta a cambio climático”, No. 320373, aprobado en el marco de la Convocatoria de Ciencia de Frontera, Modalidad: Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022”

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., (CICY), desde la infraestructura hasta los recursos disponibles, desde las oportunidades de investigación hasta los programas extracurriculares, que han fomentado mi crecimiento integral y profesional.

Al laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular, por la provisión de materiales y recursos necesarios para llevar a cabo mis actividades. Estoy agradecida por la oportunidad de ser parte de su equipo y aprovechar al máximo mi experiencia en su establecimiento.

Al laboratorio de Química de Productos Naturales y al laboratorio USF10 por los equipos prestados, su cálida acogida y apoyo durante distintas etapas de mi trabajo de tesis.

Mi sincero agradecimiento a mi asesor, el Dr. Jorge Santamaría Fernández por su guía y compromiso con mi éxito. Su sabiduría, paciencia y orientación han sido invaluable en cada etapa de mi investigación. Gracias por desafiarme a superar mis límites, por su retroalimentación constructiva y por alentarme a alcanzar la excelencia en mi trabajo.

De manera especial a la Dra. Luisa López y el Dr. Fabio Idrovo, miembros de mi comité tutorial, por su invaluable contribución y orientación durante el desarrollo de mi trabajo de tesis. Su compromiso y apoyo han sido fundamentales para mi crecimiento académico y estoy profundamente agradecida por su tiempo, conocimiento y dedicación.

A la Dra. Luisa López, Dra. Beatriz Xoconostle, Dr. Luis Sáenz, Dr. Fabio Idrovo y al Dr. Jorge Santamaría por ser parte de mi comité de revisión de tesis y examen de grado. Agradezco su disposición y tiempo, sus comentarios, sugerencias y correcciones constructivas que fortalecen mi formación profesional.

Al maestro Robert Us, por su dedicación y compromiso para transmitir conocimiento. Aprecio su paciencia y disposición para responder mis preguntas y brindarme orientación adicional.

A la Dra. Gabriela Fuentes por su apoyo y dedicación a la revisión de este trabajo de tesis.

Al maestro Eduardo Castillo y a la Dra. Leticia Peraza por la ayuda brindada dentro del laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular.

Al maestro Roberto Ku y al maestro Luis Torres, por su ayuda dentro del laboratorio USF10 y del laboratorio de Química de Productos Naturales respectivamente.

A mi amiga, Nelly Gonzales, por estar a mi lado a lo largo de este viaje. Juntas hemos enfrentado desafíos, compartido conocimientos y creado recuerdos inolvidables. Su apoyo ha sido esencial en mi estancia en México.

DEDICATORIA

A mis padres, Rosa Vilatuña y Marco Cevallos, a mi hermano y cuñada, Marco Augusto Cevallos y Cristina Díaz Cuenca, a mis sobrinas, Pía Cevallos e Isabella Cevallos, su apoyo ha sido mi fortaleza para lograr mis objetivos en otro país. Por su paciencia y sabiduría que han hecho de mi la persona que soy ahora.

PRODUCTOS ASOCIADOS

Congreso

- Octubre 2022: Ponente en el XI Congreso REDBIO 2022 con la conferencia titulada: "Caracterización fisiológica y análisis de la respuesta a estrés por alta temperatura en *Carica papaya* cv Maradol y silvestre"

Seminario

- Mejor seminario de estudiantes de maestría. Semestre 2022-II

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo I. ANTECEDENTES.....	3
1.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	3
1.1.1 Distribución y origen de <i>Carica papaya</i>	3
1.1.2 Descripción morfológica de papaya.....	3
1.1.3 Temperaturas máximas y mínimas para cultivo de Papaya.....	5
1.1.4 Temperatura en papaya: carpeloidia y esterilidad.....	5
1.1.5 Producción mundial de papaya.....	5
1.1.6 Producción Nacional de papaya.....	6
1.1.7 Efecto del aumento de temperatura sobre las plantas.....	7
1.1.8 Temperaturas mínimas y máximas en Yucatán.....	9
1.1.9 Respuesta de las plantas para generar tolerancia al calor.....	9
1.1.10 Generalidades de Heat Shock Protein, HSP.....	11
1.1.11 Hsp en respuesta al calor.....	12
1.1.12 Familia HSP.....	12
1.1.12.1 sHSP.....	13
1.1.12.2 HSP60.....	15
1.1.12.3 Hsp70.....	16
1.1.12.4 Hsp90.....	17
1.1.12.5 Hsp100.....	17
1.1.13 Interacción Hsf-Hsp.....	18
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	22
1.3 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	23
1.4 HIPÓTESIS.....	23
1.5 OBJETIVOS.....	24
1.5.1 Objetivo General.....	24
1.5.2 Objetivos específicos.....	24
1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN <i>in silico</i> , FILOGENIA Y ESTRUCTURA DE GENES QUE CODIFICAN PARA HEAT SHOCK PROTEINS EN <i>Carica papaya</i> cv. SunUp.....	27
2.1 INTRODUCCIÓN.....	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

2.2.1 Búsqueda de secuencias <i>hsp</i> de <i>Carica papaya</i> a partir de sus genes ortólogos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.2.2 Análisis y alineamiento de secuencias proteicas de genes <i>hsp</i> de <i>A.thaliana</i> y <i>C.papaya</i>	28
2.2.3 Análisis filogenético y selección de proteínas HSP de <i>C. papaya</i> a partir de genes ortólogos de <i>A. thaliana</i>	29
2.2.4 Divergencia evolutiva de proteínas HSP	29
2.2.5 Modelaje tridimensional de proteínas HSP17.8, HSP70 y HSP90 de <i>C. papaya</i>	29
2.2.6 Diseño de oligonucleótidos de genes <i>Cphsp</i> de <i>C. papaya</i> L.	29
2.3 RESULTADOS.....	30
2.3.1 Búsqueda de secuencias <i>hsp17.8</i> , <i>hsp70</i> y <i>hsp90</i> de <i>C. papaya</i> a partir de genes homólogos de <i>A.thaliana</i>	30
2.3.2 Alineamiento y análisis de dominios de secuencias proteicas HSP17.8, HSP70 y HSP90 encontradas en <i>C.papaya</i>	33
2.3.3 Análisis filogenético y tablas de divergencia de las secuencias proteicas HSP encontradas en <i>C. papaya</i> y <i>A. thaliana</i>	46
2.3.4 Modelado tridimensional de proteínas seleccionadas para cada familia HSP de <i>C.papaya</i>	52
2.3.5 Diseño de oligonucleótidos para genes <i>Cphsp17.8</i> , <i>Cphsp70</i> y <i>Cphsp90</i>	53
2.4 DISCUSIÓN.....	54
2.5 CONCLUSIONES.....	58
CAPÍTULO III. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE <i>C. papaya</i> cv Maradol y Silvestre ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA	61
3.1 INTRODUCCIÓN.....	61
3.2.1 Material vegetal	63
3.2.1.1 Tratamiento pre-germinativo	63
3.2.1.2 Germinación de semillas <i>C. papaya</i> cv Maradol y Silvestre	64
3.2.1.3 Aclimatación de plantas <i>C. papaya</i>	64
3.2.2 Ensayo de estrés por alta temperatura.....	64
3.2.3 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS.....	64
3.2.3.1 Fluorescencia de clorofila	64
3.2.3.2 Intercambio gaseoso	65
3.2.3.3 Potencial hídrico.....	65
3.2.3.4 Porcentaje de pérdida de electrolitos	65
3.2.4 Contenido de Prolina	66

3.2.5 Evaluación estadística.....	66
3.3 RESULTADOS.....	66
3.3.1 RESPUESTA FENOTÍPICA DE <i>C. papaya</i> ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA	66
3.3.3 RESPUESTA FISIOLÓGICA DE <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA.	68
3.3.3.1 Eficiencia máxima del fotosistema II e índice del rendimiento PI_{abs}	68
3.3.3.2 Cuantificación del rendimiento del fotosistema II a través de curvas O-J-I-P	69
3.3.3.3 Fotosíntesis, conductancia estomática (g_s), transpiración y CO_2 intercelular (C_i)....	70
3.3.3.4 Potencial hídrico de hojas <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre.....	72
3.3.3.5 Porcentaje de fuga de electrolitos en hoja de <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre.....	73
3.3.3.6 Contenido de prolina libre en hojas de <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre	74
3.4 DISCUSIÓN.....	75
3.5 CONCLUSIONES.....	82
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES HSP EN <i>C. papaya</i> cv Maradol y Silvestre ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA	85
4.1 INTRODUCCIÓN.....	85
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
4.2.1 Extracción de ácidos nucleicos, ARN	86
4.2.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	86
4.2.3 Reacción de PCR.....	87
4.2.4 Curva estándar y curva melt de amplificación para qRT-PCR	87
4.2.4 Cuantificación de la expresión de <i>Cphsp17.8-2</i> y <i>Cphsp90-4</i> mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$	87
4.2.5 Evaluación estadística.....	88
4.3 RESULTADOS.....	88
4.3.1 Análisis de integridad y pureza de ARN	88
4.3.2 Expresión de genes <i>Cphsp17.8-2</i> y <i>Cphsp17.8-3</i> en plantas jóvenes de <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura	89
4.3.2 Expresión de genes <i>Cphsp70-1</i> , <i>Cphsp70-6</i> , <i>Cphsp70-7</i> y <i>Cphsp70-8</i> en plantas de <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura	90
4.3.2 Expresión de genes <i>Cphsp90-1</i> y <i>Cphsp90-4</i> en plantas de <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura	92
4.3.3 Validación de oligonucleótidos <i>Cphsp17.8-2</i> y <i>Cphsp90-4</i> en <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura	93

4.3.4 Cuantificación del nivel de expresión relativa de <i>Cphsp17.8-2</i> y <i>Cphsp90-4</i> en <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura	94
4.4 DISCUSIÓN.....	95
4.5 CONCLUSIONES.....	100
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL.....	103
5.1 CONCLUSIONES GENERALES	111
5.2 PERSPECTIVAS	112
BIBLIOGRAFÍA.....	114

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

CDPK: quinasa de proteínas dependiente de calcio

CNGC: canales activados por nucleótidos cíclicos

hsf: heat shock factors (gen)

HSF: heat shock factors (proteína)

hsp: heat shock protein (gen)

HSP: heat shock protein (proteína)

NBD: dominio de unión al nucleótido

NTD: dominio N-terminal

MAPK: quinasas activadas por mitógenos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Anomalías en la temperatura de la superficie global y océanos. Las barras rojas y azules indican la variación en la temperatura (°C, izquierda o °F, derecha) en el mes de marzo desde 1850 hasta 2023 (Centro Nacional de Información Ambiental, 2023).....6

Figura 1.2. Árbol filogenético de proteínas HSP20, HSP70 y HSP90 en cuatro especies: *C. songorica* (amarillo), *O. sativa* (verde), *B. distachyon* (azul) y *Arabidopsis* (rojo) (Yan et al., 2020).....12

Figura 1.3. Dominios conservados (N-terminal, α -cristalino y C-terminal) en las secuencias de la familia sHSP en *Arabidopsis thaliana*.....13

Figura 1.1. Modelo de interacción HSF-HSP70 en respuesta a estrés por alta temperatura. 1, complejo entre monómeros HSF y HSP70. 2, cuando existe estrés por calor los monómeros HSF se trimerizan 3. Ingresan al núcleo y se unen al ADN. 4 y 5, inician la transcripción de proteínas HSP. 6 y 7 cuando HSP70 es abundante, se une a los trímeros de HSF fosforilados, separándose del ADN. 8, en el citoplasma los trímeros de HSF se desfosforilan y se separan de HSP70. De nuevo los monómeros HSF forman el complejo HSF-HSP70, en ausencia de estrés (Taiz & Zeiger, 2002).....18

Figura 1.2. Percepción del calor y mecanismos que inducen termotolerancia. Durante estrés por alta temperatura, cambios en la fluidez de la membrana activa sensores de calor, CNGC (cyclic nucleotide-gated channels, por sus siglas en inglés) que activan HSFA1. Las proteínas desnaturalizadas por el calor reclutan HSP90 y HSP70. La disociación de HSP70-90 permite la hiperfosforilación de HSFA1 para su translocación al núcleo y unión al ADN. HSFA1 puede mediar señales que remuevan las histonas unidas a los genes HSP. Finalmente, la ARN polimerasa II iniciará la transcripción de *hsfa2*, formando un complejo super activador HSFA1-HSFA2 para la transcripción de *hsf* (Bourgine & Guihur, 2021).....20

Figura 1.3. Vías de interacción entre genes *hsf* y *hsp* en *Populus trichocarpa*. Los nodos representan genes *hsf* y *hsp*, mientras que las líneas constituyen la interacción de coexpresión. Los códigos de color representan cada familia de genes. Los diamantes rojos corresponden a *hsf*, mientras que los círculos sólidos naranja, amarillo, verde, turquesa y púrpura indican *shsp*, *hsp60*, *hsp70*, *hsp90*, *hsp100* respectivamente (Tian et al., 2021).....21

Figura 1.7. Estrategia experimental de la tesis “Caracterización y análisis de la expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* en respuesta a estrés por calor en *Carica papaya* cv Maradol y silvestre”. El capítulo II constituye la parte bioinformática del trabajo. El capítulo III, se enfoca en el análisis fisiológico. El capítulo IV, hace referencia al análisis de expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90*. Finalmente, el capítulo V presenta la discusión general de resultados y conclusiones.....24

Figura 2.1. Alineamiento de secuencias HSP17.8 de *A. thaliana* (At), *Populus trichocarpa* (Pt) y *C. papaya* (Cp). Las sombras en negro y gris indican conservación en los residuos al 100% y

75% respectivamente, mientras que el fondo blanco corresponde a residuos divergentes. Las cajas azules señalan las regiones consenso dentro del dominio α -cristalino, mientras que la línea verde corresponde al motivo N-terminal de la subclase, citosol I. “ / ” abarca los dominios en el alineamiento señalados con flechas amarillas.....32

Figura 2.2. Motivos conservados y su valor p de HSP17.8 de *C. papaya*, *A. thaliana* y *P. trichocarpa*.....32

Figura 2.3. Alineamiento de secuencias Hsp70 de *C. papaya* (Cp), *A. thaliana* (At). Las sombras en negro y gris indican conservación en los residuos al 100% y 75% respectivamente, mientras que el fondo blanco corresponde a residuos divergentes. “ / ” abarca los dominios en el alineamiento señalados con flechas amarillas. Las cajas azules indican las 3 firmas conservadas para las proteínas HSP70. Por otro lado, las cajas naranja, morada y verde corresponden a los motivos correspondientes a la mitocondria, citosol y cloroplasto respectivamente.....38

Figura 2.4. Motivos conservados y valor p de HSP70 de *C. papaya* y *A. thaliana*.....39

Figura 2.5. Alineamiento de secuencias HSP90 de *C. papaya* (Cp) y *A. thaliana* (At). Las sombras en negro y gris indican conservación en los residuos al 100% y 75% respectivamente, mientras que el fondo blanco corresponde a residuos divergentes. Secuencias características de Hsp90 “ — ”; citoquina de cuatro hélices “- - -”. Dominios en el alineamiento señalados con flechas amarillas” / “. La caja azul indica el motivo conservado de proteínas HSP90, mientras que la caja naranja y amarilla corresponden a motivos del RE y citosol respectivamente. Los números rojos sobre la alineación muestran los residuos funcionalmente importantes: 1 (ácido glutámico, E) para la hidrólisis de ATP; 2 (ácido aspártico, D) para la unión de ATP; 3, 5, 6, 7 y 8 (glicina, G) para la unión de GA y p23; 4 (lisina, K) para la unión de GA; 9 (serina, S) para la fosforilación por la caseína quinasa II; 10 (fenilalanina, F) para la interacción entre dominios; 11 (arginina, R) y 12 (glutamina, Q) para actividad ATPasa.....42

Figura 2.6. Motivos conservados y valor p de HSP90 de *C. papaya* y *A. thaliana*.....43

Figura 2.7. Árbol filogenético entre secuencias proteicas HSP17.8 de *A. thaliana*, *P. trichocarpa* y *C. papaya*. La construcción filogenética se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximun Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó LG model con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5.....44

Figura 2.8. Árbol filogenético entre secuencias proteicas HSP70 de *A. thaliana*, y *C. papaya*. La construcción filogenética se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximun Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó LG model con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5.....47

Figura 2.9. Árbol filogenético entre secuencias proteicas HSP90 de *A. thaliana*, y *C. papaya*. La construcción filogenética se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximun Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó LG model con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5.....49

Figura 2.10. Modelado tridimensional de proteínas seleccionadas. a) CpHSP17.8, b) CpHSP70 y c) CpHSP90, con el programa en línea Swiss-Model: <https://swissmodel.expasy.org/>.....51

Figura 3.1. Respuesta fenotípica en plantas jóvenes de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo T₀ (25°C), tiempo de exposición T₁ de 2h (50 °C) y tiempo de recuperación T₂ de 168h (25°C).....63

Figura 3.2. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) e Índice rendimiento PI_{abs} en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 (28 ± 2°C), tiempo de exposición 2h (25°C y 50 °C) y tiempo de recuperación 168h (28 ± 2°C). Las barras en los puntos corresponden a la media +/- la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0.05) encontradas entre la media de los tratamientos.....64

Figura 3.3. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila polifásica (O-J-I-P transitoria) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 (28 ± 2°C), tiempo de exposición 2h (25°C y 50 °C) y tiempo de recuperación 168h (28 ± 2°C). Diferentes letras minúsculas corresponden a diferencias significativas (p<0.05) encontradas entre la media de los tratamientos.....65

Figura 3.4. a) Fotosíntesis (μmolCO₂m⁻²s⁻¹), b) conductancia estomática (molH₂Om⁻²s⁻¹), c) transpiración (mmolH₂Om⁻²s⁻¹) y d) CO₂ Intercelular (μmolCO₂mol⁻¹) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 (28 ± 2°C), tiempo de exposición 2h (25°C y 50 °C) y tiempo de recuperación 168h (28 ± 2°C). Las barras en los puntos corresponden a la media +/- la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0.05) encontradas entre la media de los tratamientos.....67

Figura 3.5. Potencial Hídrico (MPa) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura (Anova p<0.5) a tiempo 0 (28 ± 2°C), tiempo de exposición 2h (25°C y 50 °C) y tiempo de recuperación 168h (28 ± 2°C). Las barras en los puntos corresponden a la media +/- la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0.05) encontradas entre la media de los tratamientos.....68

Figura 3.6. Pérdida de electrolitos (%) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 (28 ± 2°C), tiempo de exposición 2h (25°C y 50 °C) y tiempo de recuperación 168h (28 ± 2°C). Las barras en los puntos corresponden a la media +/- la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0.05) encontradas entre la media de los tratamientos.....69

Figura 3.7. Contenido relativo de prolina (mg/g peso fresco) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 (28 ± 2°C), tiempo de exposición 2h (25°C y 50 °C) y tiempo de recuperación 168h (28 ± 2°C). Las barras en los puntos corresponden a la media +/- la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0.05) encontradas entre la media de los tratamientos.....70

Figura 4.1. Subunidades de ARN ribosomal correspondientes a *C. papaya* cv Maradol y silvestre para cada tratamiento. Gel de agarosa 1.5%, teñido con SYBR Safe. Ma, Maradol control 0h (28

± 2°C); Mb, Maradol tiempo de exposición 2h (50°C); Mc, Maradol recuperación 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C); Sa, silvestre control 0h (28 ± 2°C); Sb, silvestre tiempo de exposición 2h (50°C); Sc, silvestre recuperación 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C).....83

Figura 4.2. Expresión semicuantitativa de *Cphsp17.8-2* y *Cphsp17.8-3* en *C.papaya* cv Maradol y silvestre bajo 3 tratamientos: control, 0h (28 ± 2°C); tiempo de exposición, 2h (50°C); recuperación, 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C) en A) hoja y B) raíz. El gel *CpEF1α* se utilizó como gen de referencia. Gel de agarosa 2%, teñido con SYBR Safe. M, Maradol; S, silvestre; PM, peso molecular 100pb; -, control negativo.....84

Figura 4.3. Expresión semicuantitativa de *Cphsp70-1*, *Cphsp70-6*, *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8* en *C.papaya* cv Maradol y silvestre bajo 3 tratamientos: control, 0h (28 ± 2°C); tiempo de exposición, 2h (50°C); recuperación, 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C) en A) hoja y B) raíz. El gel *CpEF1α* se utilizó como gen de referencia. Gel de agarosa 2%, teñido con SYBR Safe. M, Maradol; S, silvestre; PM, peso molecular 100pb; -, control negativo.....85

Figura 4.4. Expresión semicuantitativa de *Cphsp90-1*, y *Cphsp90-4* en *C.papaya* cv Maradol y silvestre bajo 3 tratamientos: control, 0h (28 ± 2°C); tiempo de exposición, 2h (50°C); recuperación, 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C) en A) hoja y B) raíz. El gel *CpEF1α* se utilizó como gen de referencia. Gel de agarosa 2%, teñido con SYBR Safe. M, Maradol; S, silvestre; PM, peso molecular 100pb; -, control negativo.....86

Figura 4.5. A) Curva estándar para *Cphsp17.8-2* a partir de 300ng de ARN. Los valores de Ct para cada dilución hecha por triplicado se indican en la parte izquierda de la figura A, así como la ecuación de la recta y el valor de regresión lineal R². B) Curva melt de *Cphsp17.8-2* con un solo pico de fluorescencia. La línea roja representa el control negativo de la reacción. C) Curva estándar para *Cphsp90-4* a partir de 300ng de ARN. Los valores de Ct para cada dilución hecha por triplicado se indican en la parte izquierda de la figura A, así como la ecuación de la recta y el valor de regresión lineal R². D) Curva melt de *Cphsp90-4* con un solo pico de fluorescencia. La línea roja representa el control negativo de la reacción.....88

Figura 4.6. A) Nivel de expresión relativa de *Cphsp17.8-2* de *C. papaya* cv Maradol y silvestre (p<0.05), B) Nivel de expresión relativa de *Cphsp90-4* bajo 3 tratamientos: control 0h (28 ± 2°C), tiempo de estrés: 2h (50°C) y etapa de recuperación: 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C).89

Figura 5.1. Modelo hipotético de la participación de HSP en el plegamiento correcto de proteínas desnaturalizadas. El estrés por altas temperatura puede afectar la eficiencia del fotosistema II y comprometer la fotosíntesis, como resultado el índice de rendimiento PI_{abs} y la relación de fluorescencia Fv/Fm disminuyen, lo que afecta la capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis de manera efectiva. En respuesta al estrés, las plantas pueden desencadenar una serie de respuestas fisiológicas, así como la acumulación de osmolitos, como la prolina para protegerse y adaptarse a las condiciones adversas. De la misma forma, la alta temperatura puede romper los enlaces no covalentes que mantienen la estructura tridimensional de las proteínas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, como resultado las proteínas se despliegan y pierden su función biológica. Esto es especialmente relevante en proteínas involucradas en la fotosíntesis y en aquellas que se están importando a los organelos celulares. De esta forma, las HSP ayudan al correcto plegamiento de proteínas desplegadas o recién

synthesized to avoid the formation of non-functional aggregates by providing cyto protection to the cell.....102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Secuencias correspondientes a <i>hsp17.8</i> obtenidas, según su número de accesión, de la base de datos TAIR y PopGenie, junto con su localización celular.....	28
Tabla 2.2. Secuencias <i>hsp17.8</i> de <i>C. papaya</i> obtenidas a partir de sus genes ortólogos de <i>A. thaliana</i> y <i>P. trichocarpa</i> . Se presenta su valor esperado (E) y el porcentaje de identidad.....	28
Tabla 2.3. Secuencias correspondientes a <i>hsp70</i> de <i>A. thaliana</i> obtenidas, según su número de accesión, de la base de datos NCBI. Se presenta su número de accesión, localización celular y niveles de expresión.....	29
Tabla 2.4. Secuencias <i>hsp70</i> de <i>C. papaya</i> obtenidas a partir de sus genes ortólogos de <i>A. thaliana</i>	30
Tabla 2.5. Secuencias correspondientes a <i>hsp90</i> de <i>A. thaliana</i> según su número de accesión obtenidas de la base de datos NCBI.....	30
Tabla 2.6. Secuencias <i>hsp90</i> de <i>C. papaya</i> obtenidas a partir de sus genes ortólogos de <i>A. thaliana</i>	30
Tabla 2.7. Miembros <i>hsp17.8</i> identificados en <i>C. papaya</i> . Se indica el nombre del gen, el ORF, número de aa, peso molecular y la localización predicha de las proteínas.....	31
Tabla 2.8. Miembros HSP70 identificados en <i>C. papaya</i> . Se indica el nombre del gen, el ORF, número de aa, peso molecular y la localización predicha de las proteínas.....	32
Tabla 2.9. Miembros <i>hsp90</i> identificados en <i>C. papaya</i> . Se indica el nombre del gen, el ORF, número de aa, peso molecular y la localización predicha de las proteínas.....	39
Tabla 2.10. Porcentajes de identidad entre secuencias proteicas HSP17.8 de <i>A. thaliana</i> , <i>P. trichocarpa</i> y <i>C. papaya</i>	45
Tabla 2.11. Porcentajes de identidad entre secuencias HSP70 de <i>A. thaliana</i> y <i>C. papaya</i>	48
Tabla 2.12. Porcentajes de identidad entre secuencias proteicas HSP90 de <i>A. thaliana</i> , <i>P. trichocarpa</i> y <i>C. papaya</i>	49
Tabla 2.13. Diseño de oligonucleótidos para genes <i>Cphsp17.8</i> , <i>Cphsp70</i> y <i>Cphsp90</i>	51
Tabla 4.1. Cuantificación de ARN (ng/μL) y relación de pureza A260/280 y A260/230 de hoja y raíz de <i>C. papaya</i> cv Maradol y silvestre en diferentes tratamientos.....	82

RESUMEN

El cambio climático representa un desafío significativo para la agricultura y la seguridad alimentaria en América Latina. Cambios en los patrones de lluvia, temperaturas extremas, sequía y otros fenómenos climáticos afectan el rendimiento de los cultivos.

El aumento de temperatura perturba la homeostasis celular de las plantas y como consecuencia, se forman agregados de proteínas o proteínas mal formadas que afectan los procesos bioquímicos de la célula lo que, desencadena una cascada de señales tanto a nivel fisiológico como molecular. Uno de los mecanismos de respuesta involucra la síntesis de Heat Shock Proteins (proteínas de choque térmico, HSP) que, como chaperonas, actúan protegiendo a las células al estabilizar y/o replegar las proteínas desnaturalizadas. Por lo que, comprender el mecanismo de tolerancia al calor y la caracterización molecular de los genes relacionados es esencial para desarrollar cultivares tolerantes y asegurar una producción sostenible de papaya en condiciones climáticas cambiantes, a su vez, que, es fundamental satisfacer las necesidades de alimento de una población en crecimiento.

Ante la importancia agronómica de *Carica papaya* y el creciente interés por atenuar el impacto del cambio climático, se propuso evaluar el efecto de la exposición a estrés por alta temperatura (50°C/2h) en dos genotipos de *C. papaya* (Maradol y silvestre) a nivel fisiológico y molecular. La diferencia en los resultados fisiológicos entre genotipos reveló que el genotipo silvestre presenta una mejor respuesta termo tolerante que el genotipo comercial, mostrando una mayor eficiencia fotosintética al recuperarse 52% más que el genotipo Maradol. De igual manera, silvestre presentó 175% y 62% más en valores de conductancia y transpiración respectivamente, lo que sugiere un mejor mecanismo de enfriamiento que ayuda a proteger las hojas de altas temperaturas y mantener la función fotosintética. Así mismo el genotipo Maradol experimentó una mayor disminución en el potencial hídrico que el genotipo silvestre. Esto sugiere que, el genotipo comercial, durante el proceso de domesticación perdió parte de la tolerancia a altas temperaturas que si están presentes en genotipos silvestres.

El análisis de expresión semicuantitativa de genes *Cphsp* en el genotipo Maradol y silvestre indicó que los perfiles de expresión de los genes evaluados diferían entre los genotipos y tejidos vegetales (hoja y raíz). Adicionalmente, el perfil de expresión cuantitativa reveló una mayor expresión de *Cphsp90-4* en el genotipo silvestre lo que sugiere que este gen podría desempeñar un papel importante en la respuesta a estrés por alta temperatura. Por lo que, podría considerarse como un candidato potencial para el mejoramiento genético de cultivares comerciales de papaya.

ABSTRACT

Climate change represents a significant challenge for agriculture and food security in Latin America. Changes in rainfall patterns, extreme temperatures, drought, and other climate phenomena affect crop yields.

Rising temperatures disrupts the cellular homeostasis of plants, leading to the formation of protein aggregates or misfolded proteins that affect the biochemical processes within the cell, triggering a cascade of signals at both the physiological and the molecular levels. One of the response mechanisms involves the synthesis of Heat Shock Proteins (HSPs) which, as chaperones, protect cells by stabilizing and/or refolding denatured proteins. Therefore, understanding the heat tolerance mechanism and the molecular characterization of the related genes is essential for developing tolerant cultivars and ensuring sustainable papaya production under changing climatic conditions, while also addressing the food needs of a growing population.

Given the agronomic importance of *Carica papaya* and the increasing interest in mitigating the impact of climate change, we proposed to evaluate the effect of exposure to high-temperature stress (50°C/2h) on two genotypes of *C. papaya* (Maradol and wild) at the physiological and molecular levels. The difference in physiological results between genotypes revealed that the wild genotype exhibits a better thermotolerant response than the commercial genotype, showing a 52% higher photosynthetic efficiency upon recovery compared to the Maradol genotype. Similarly, the wild genotype showed 175% and 62% higher values of conductance and transpiration, respectively, suggesting a better cooling mechanism that helps to protect the leaves from high temperatures and to maintain photosynthetic function. In contrast, the Maradol genotype experienced a greater decrease in water potential than the wild genotype. This suggests that the commercial genotype, during the domestication process, lost some of the tolerance to high temperatures that are still present in wild genotypes.

Semiquantitative (RT-PCR) gene expression analysis of *Cphsp* genes in the Maradol and wild genotypes indicated that the expression profiles of the evaluated genes differed between genotypes and plant tissues (leaf and root). Additionally, quantitative expression profiling (qRT-PCR) revealed higher expression of *Cphsp90-4* in the wild genotype, suggesting that this gene may play an important role in the response to high-temperature stress. Therefore, it could be considered as a potential candidate for genetic improvement of commercial papaya cultivars.

INTRODUCCIÓN

La elevada temperatura junto con la disponibilidad de agua son los principales factores abióticos que afectan el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas. La afectación por altas temperaturas puede presentarse desde un crecimiento retardado hasta daño en los órganos y muerte de la planta, lo que, a su vez, provoca la proliferación de malas hierbas y pestes, incidiendo en su rendimiento y productividad (Box, 2016).

América latina experimentará incrementos de temperatura y descensos de lluvia en todo el continente por los gases de efecto invernadero con mayor impacto en América Central y el Caribe. Adicionalmente, las poblaciones rurales de los países en vías de desarrollo dependen de la agricultura para subsistir, por lo tanto, conforme aumenta la población, los cultivos deben adaptarse a estas nuevas variaciones ambientales para satisfacer las necesidades de alimento y mantener la seguridad alimentaria, misma que, tendrá que aumentar en 70% para el año 2050, cuando se espera que la población mundial sea de 9 mil millones (Bita & Gerats, 2013).

A nivel celular, el aumento de temperatura perturba la homeostasis celular y como consecuencia se forman agregados de proteínas o proteínas mal formadas que afectan los procesos bioquímicos de la célula. La respuesta al estrés térmico involucra una serie de cambios en el metabolismo que le permiten a las células de la planta adaptarse al estrés por calor. Ante esto, una cascada de señales ocurre tanto a nivel fisiológico como molecular. Uno de los mecanismos de respuesta involucra la síntesis de Heat Shock Proteins (proteínas de choque térmico, HSP) que, como chaperonas, actúan protegiendo a las células al estabilizar y/o replegar las proteínas desnaturalizadas (Rehman et al., 2020).

Carica papaya, debido a sus propiedades organolépticas, nutricionales y medicinales es el tercer cultivo tropical que se produce a nivel mundial. México, por su parte, destaca como principal exportador de esta fruta (SAGARPA, 2017). Para el 2030, se estima un aumento en la demanda mundial de papaya de 1.13 a 1.29 millones de toneladas métricas y de producción nacional de 0.95 a 1.24 millones de toneladas métricas que representa un crecimiento acumulado de 13.58 % y 30.14 % respectivamente (SAGARPA, 2017).

Capítulo I. ANTECEDENTES

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Distribución y origen de *Carica papaya*.

El cultivo de *Carica papaya* está ampliamente distribuido alrededor del mundo por su capacidad de adaptación a ambientes tropicales y subtropicales. De los 3 centros de origen de las especies de plantas (Mesoamérica, Mesopotamia y centro del Norte de China) descritos por Vavilov (1987), Mesoamérica, que incluye la región desde el sureste de México hasta Costa Rica, es el centro de origen de importantes cultivos tropicales. Por lo que, se ha sugerido como un buen candidato para ser el centro de origen de *C. papaya* L. (Fuentes & Santamaría, 2014).

Carica papaya es un miembro de la familia Caricaceae, compuesta por 6 géneros y 35 especies, de las cuales 32 son dioicas. Dentro de los géneros de esta familia se encuentran: *Carica* (1 especie), *Vasconcellea* (21 especies), *Jarilla* (3 especies), *Horovitzia* (1 especie), *Cylicomorpha* (2 especies) y *Jacaratia* (7 especies). A diferencia de las especies del género *Vasconcellea* que se desarrollaron principalmente en América del Sur, la especie del género *Carica* parece tener una distribución en el sur de México y Centroamérica. Adarhya (1999), sugiere que un ancestro de *C. papaya*, así como los progenitores de los géneros *Horovitzia* y *Jarilla* que son endémicos de Centroamérica, pudieron dispersarse a través de las islas entre continentes y, de esta forma, continuó su evolución de manera aislada del resto de miembros de la familia Caricaceae al cortarse la ruta de migración (Aradhya & Manshardt, 1999). Adicionalmente, se puede relacionar a su centro de origen en Mesoamérica debido a que poblaciones de papaya silvestre, no domesticada aún crecen en estas regiones tropicales y subtropicales de México y Centroamérica (Fuentes & Santamaría, 2014). Actualmente se cultiva en todas regiones tropicales y subtropicales de América, desde México hasta Argentina y Brazil, también es ampliamente cultivada en África y Asia (FAO, 2020).

1.1.2 Descripción morfológica de papaya

Carica papaya es una planta herbácea perennifolia con tronco monopodial, único y, generalmente, no ramificado que puede alcanzar los 10 metros de altura. De crecimiento rápido, puede producir frutos maduros después de 9-12 meses de haber sido plantado. Sus hojas, de color verde, con lámina palmeada de hasta 80 cm de longitud, tiene lóbulos profundos sostenidos

por peciolo largos y huecos (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017). Una planta sana puede llegar a tener hasta 30 hojas funcionales. Las flores pueden ser estaminadas, pistiladas y bisexuales. Las flores femeninas son más grandes y redondas en la base, poseen estigma, pero carecen de estambres, se ubican en las axilas del peciolo de la hoja, cuyo fruto después pasará a ocupar tal posición, suelen ser solitarias o con 6 flores juntas. Las flores masculinas, por su parte, son delgadas, tubulares y producen inflorescencias, llegando a tener 100 florecillas. Las flores hermafroditas tienen un tamaño intermedio entre las flores femeninas y masculinas, una estructura perfecta con estigma y estambre funcionales (CONABIO, 2008).

Las papayas silvestres producen frutos pequeños de 4-6 cm de largo y 8 cm de diámetro, mesocarpio delgado y poca pulpa, con 200-400 semillas. Mientras que el fruto cultivado mide de 10-50 cm de largo y de 7-15 cm de diámetro dependiendo del tipo del cultivo. Las semillas están cubiertas por una capa de mucílago (sarcotesta), endotesta negra y arrugada y endospermo presente. El sistema radical tiene forma radial con raíz pivotante y un radio que se extiende hasta 1.80 m (CONABIO, 2008; SAGARPA, 2017).

Existen 3 tipos sexuales de árboles de papaya: hembra, macho y hermafrodita. A diferencia de la papaya silvestre que su mayoría de individuos son dioicas, los individuos de papaya cultivada pueden ser dioicas o hermafroditas con un número cromosómico $2n = 18$ (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017; CONABIO, 2018).

Su fruto, de cascara lisa, con color verde antes de su maduración y de color amarillo a naranja con puntos oscuros cuando está maduro, posee un mesocarpio dulce, suave y jugoso con pulpa color salmón de sabor ligeramente ácido, es altamente consumido tanto por sus propiedades organolépticas, así como, por su alto nivel nutritivo. El fruto es rico en vitamina A y C, fenoles, β -caroteno, calcio y fibra (Dotto, & Abihudi, 2021). Dentro de las 38 frutas más comunes, la papaya ha alcanzado el primer lugar en puntajes nutricionales (Huerta-Ocampo et al., 2012). Diferentes partes como, las hojas, cortezas, raíces, flores, frutos, semillas y látex se utilizan como medicina natural para tratar una amplia gama de enfermedades, varios estudios científicos han validado esta información al comprobar sus actividades terapéuticas. Por ejemplo: antifúngica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatoria, hipoglucémica, antitumoral y neuroprotectora (Krishna, 2008). La mayoría de estas propiedades se deben a los compuestos antioxidantes presentes en los órganos de la papaya y al contenido de polifenoles de los frutos (Chan-León et al., 2021; Panzarini, 2014).

1.1.3 Temperaturas máximas y mínimas para cultivo de Papaya

Carica papaya puede crecer en climas tropicales y subtropicales por lo que la humedad y el calor son necesarios para su correcto desarrollo y fructificación. Sin embargo, la temperatura óptima para esta especie es una media anual es de 25 °C con extremos del rango interior desde 21°C a 33 °C. Por lo que, el rendimiento se ve afectado con temperaturas inferiores a 18 °C y superiores a 36°C. Esta especie se cultiva en elevaciones inferiores a los 400 m.s.n.m y precipitaciones medias anuales de 1500 mm a 2500 mm (CONABIO, 2008).

1.1.4 Temperatura en papaya: carpeloidia y esterilidad

En plantas hermafroditas de *C. papaya* la expresión sexual es variable y altamente influenciada por factores ambientales. Temperaturas menores a 17 °C y superiores a 35 °C provocan la caída de las flores y carpeloidia de los estambres, es decir, la transformación de estos en carpelos adicionales, resultando en la malformación de ovarios y posteriormente de los frutos. A estas flores se las conoce como flores pentándricas, que darán origen a frutos con surcos profundos en la pared del ovario, similares a los producidos por flores femeninas, lo que afecta su valor comercial nitrógeno (Bogantes & Mora Newcomer, 2017). Así mismo, la carpeloidia también se ve influenciada por la alta humedad del suelo, la humedad relativa y niveles altos de nitrógeno. Adicionalmente un segundo problema, se relaciona con la esterilidad femenina, donde existe una disminución progresiva del número de carpelos, acompañado de la pérdida de estigmas y haces vasculares de los ovarios lo que da como resultado una fruta alargada y deformada sin valor comercial. Como resultado, la productividad y rendimiento de papaya se ven afectados cuando se siembra en el ciclo de invierno y la floración y fructificación coinciden con el incremento de temperatura durante los meses de abril a junio (Bogantes & Mora 2017).

1.1.5 Producción mundial de papaya

Papaya es el tercer cultivo tropical con mayor producción a nivel mundial después del mango y la piña, por lo que representa uno de los más importantes desde el punto de vista económico y social. En 2018, se alcanzó una producción mundial de 13.6 millones de toneladas siendo sus mayores productores Brasil e India, seguido de México, Indonesia, República Dominicana y Nigeria (FAO, 2020). Por su parte, el continente americano produce 4 millones de toneladas, América del sur con el 53% (2.1 millones de toneladas), mientras que América central y el Caribe contribuyen con el 48% (1.9 millones de toneladas) de la producción (Santamaría., 2017). Una

densidad de 1500 a 2500 árboles por hectárea puede producir de 125000 a 300000 libras de frutos por hectárea por año. (Chávez-Pesqueira & Núñez-Farfán, 2017).

1.1.6 Producción Nacional de papaya

Se destaca México como exportador principal, representa el 0.68% del PIB agrícola nacional y 4.45% de la producción de frutas (SAGARPA, 2017). Ocupa el tercer lugar con 951,922 toneladas por año y rendimiento de 56,595.4 kg/ha a nivel mundial, lo que le permite destinar la quinta parte de la producción a mercados internacionales, siendo su destino líder Estados Unidos con el 84% de la exportación total. En 2015, el 73% de la producción se concentró en los estados de Oaxaca, Chiapas, Colima y Veracruz. Adicionalmente, este cultivo abarca el 1.5 % y 1.4 % del total de la superficie sembrada y cosechada (Valencia et al., 2017).

A pesar de la importancia económica del fruto a nivel nacional, los productores se enfrentan a nuevos retos que influyen en la tasa de crecimiento y rendimiento del cultivo, como; costos de producción, ausencia de tecnología e infraestructura y la falta de capacitación y estrategias, además de los problemas propios del cultivo, entre estos: plagas y enfermedades víricas, los factores climáticos como sequía y variaciones extremas de temperatura también comprometen la producción del cultivo (Valencia et al., 2017). De la igual manera, en 2018, Brasil experimentó un decrecimiento en su producción por cuarto año consecutivo debido a condiciones meteorológicas fluctuantes, 16 % menos en comparación con 2017. Durante ese año la producción de papaya en Brasil fue de 890,000 toneladas en comparación con 1,6 millones de toneladas en 2014, experimentando escasez de suministros a nivel nacional e incrementado su precio, dejando que la exportación cayera en 10% comparado con el 2017 (FAO, 2020).

La importancia de la industria papayera en México es evidente. Cada año se mantiene una superficie cosechada cercana a 20mil hectáreas con volúmenes de producción de 900mil toneladas anuales. Si bien, la mayoría de la exportación de este fruto se destina a Estados Unidos, es importante diversificar los mercados de exportación al identificar las características de fruto que exigen otros mercados con la finalidad de desarrollar variedades con características deseadas, como: mayor vida de anaquel, tolerancia a plagas y fluctuaciones ambientales que generen competencia en mercados como los de Canadá, Europa y Japón (Santamaría., 2017).

1.1.7 Efecto del aumento de temperatura sobre las plantas

Una ola de calor es un periodo inusual de clima con temperaturas elevadas que, generalmente, dura dos o más días. Para ser considerada una ola de calor, la temperatura debe estar fuera de los promedios históricos para un área determinada. Es importante destacar que, a pesar de la variación natural del clima, el cambio climático antropogénico está acelerando y amplificando estos eventos extremos (USGCRP., 2017). Es por esto por lo que, debido al continuo aumento de gases de efecto invernadero, la temperatura media global incrementará de 1 a 3.7 °C para el final del siglo XXI. Por lo que, se prevé que las olas de calor sean más intensas, frecuentes y duraderas de lo que se conoce actualmente (Sage et al., 2015).

El mes de marzo del 2023 se caracterizó por ser el segundo -marzo- más cálido del mundo en el registro de 174 años de la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) al presentar 1.24°C por encima del promedio del siglo XX (Figura 1.1). La anomalía en la temperatura de marzo 2023 fue la tercera más alta después de marzo 2016 y febrero 2016. Por su parte, la temperatura global de la tierra registró 2.26°C por encima del promedio, mientras que las temperaturas de los océanos ocuparon el tercer lugar más cálido registrado en marzo (Centro Nacional de Información Ambiental, 2023).

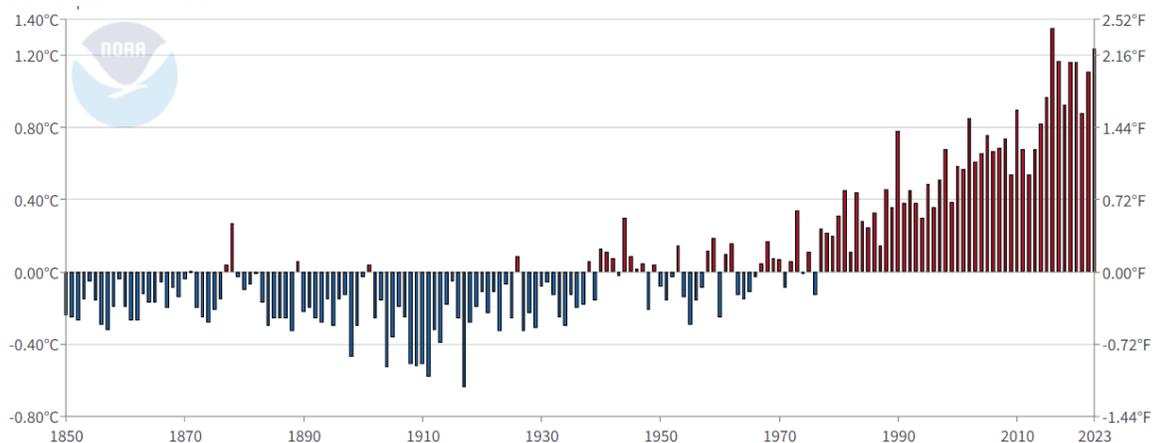


Figura 1.3. Anomalías en la temperatura de la superficie global y océanos. Las barras rojas y azules indican la variación en la temperatura (°C, izquierda o °F, derecha) en el mes de marzo desde 1850 hasta 2023 (Centro Nacional de Información Ambiental, 2023).

El correcto crecimiento y desarrollo de las plantas dependen de factores climáticos como: la radiación solar, temperatura y lluvia. El estrés, provocado por factores abióticos conduce a cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan el rendimiento de los cultivos. Los factores que inducen mayor daño celular en plantas son; calor, sequía, temperaturas extremas y salinidad. A pesar de que variaciones en la temperatura ocurren durante el crecimiento y reproducción normal de la planta, fluctuaciones extremas durante el verano o

invierno pueden afectar sus interacciones moleculares necesarias para el desarrollo y producción de frutos. El estrés por calor puede presentarse como olas suaves y duraderas a pasar a olas de calor cortas e intensas causando pérdidas significativas de cultivo con grandes riesgos para la seguridad alimentaria en el futuro (Bita & Gerats, 2013). Por lo que, la producción agrícola enfrenta nuevos desafíos que amenazan la seguridad alimentaria mundial, a lo que se adiciona, el aumento continuo de población y la reducción de tierra cultivable. De la misma manera, este tipo de estrés provoca mayor susceptibilidad en plantas a adquirir enfermedades por patógenos con considerables implicaciones económicas (Cohen & Leach 2020).

Existe un mayor efecto negativo por incremento de temperatura, durante la etapa reproductiva de los cultivos que en su etapa de crecimiento (Zinn et al., 2010). Generalmente, el desarrollo de nudos y hojas tiene una temperatura óptima mayor que la temperatura óptima durante el desarrollo reproductivo. Las altas temperaturas durante esta última fase afectarán la viabilidad del polen, la fertilización y la formación del grano o fruto, reduciendo el rendimiento del cultivo. En el maíz, la viabilidad del polen se reduce por exposición a temperaturas mayores a 35°C y la misma respuesta se ve reflejada en arroz, cuya viabilidad del polen disminuye a temperaturas mayores a 33°C y cesa cuando excede los 40°C (Hatfield & Prueger, 2015).

Las reacciones bioquímicas y estructura de las macromoléculas de las plantas están gobernadas por la temperatura, una temperatura fuera del rango óptimo afecta el funcionamiento de las reacciones y metabolismo de la planta, provocando la desnaturalización de proteínas y acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno, ROS (de sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species), en especial en la fotosíntesis, respiración celular y conductancia estomática (Overdieck, 2016; Jespersen 2020).

Cada especie de planta tiene su propio rango de temperatura: mínimo, máximo y óptimo para su crecimiento y desarrollo. Un rango de temperatura fisiológicamente óptimo para la planta permitirá que eventos como la germinación, floración y que, el desarrollo en general no se vea negativamente afectado. Temperaturas fuera de este rango comprometen la supervivencia de la planta y se las denomina umbrales críticos o temperaturas extremas, lo que daña sus células y tejidos provocando la muerte de la planta (Bahuguna & Jagadish, 2015). Sin embargo, en condiciones extremas de temperatura se pierden las funciones celulares debido a la desnaturalización de proteínas. La pérdida de estructura de las proteínas perturba el metabolismo y se forman agregados lo que resulta tóxico para la célula (Jespersen 2020).

Plantas como *Nicotiana rustica*, *Cucurbita pepo* y *Brassica napus* no sobreviven cuando se exponen a temperaturas entre 49°C-51°C durante 10min (Taiz & Zeiger, 2002).

Si bien la magnitud del estrés por calor depende de cada especie de planta existen factores constantes que afectan negativamente a las mismas, como; el incremento en la demanda de vapor de agua atmosférico conforme aumenta la temperatura del aire lo que provoca mayor transpiración de agua en las hojas, hasta que el suministro se ve limitado y la conductancia estomática decrece llevando a un mayor incremento de temperatura en las hojas y reducción de la fotosíntesis. Durante la exposición de la planta a temperaturas extremas, el estrés hídrico ocurre de manera rápida debido a que la planta no posee la capacidad suficiente de extraer agua del suelo para hacer frente al aumento de la demanda atmosférica (Hatfield & Prueger 2015).

La transpiración en plantas ocurre a través de los estomas en las hojas, mediante intercambio de gases y vapor de agua de la planta hacia la atmósfera y se ve directamente afectada por factores ambientales ya que depende del aporte de energía, del gradiente de presión del vapor y de la velocidad del viento, por lo que, la tasa de evapotranspiración se reduce cuando el cultivo crece bajo condiciones de estrés abiótico debido a una disminución en el crecimiento y densidad de plantas, menor área foliar y disponibilidad de agua en el suelo (Hatfield & Prueger 2015).

1.1.8 Temperaturas mínimas y máximas en Yucatán.

En el año 2021, en el estado de Yucatán la temperatura máxima promedio se registró en el mes de abril con 36.4 °C mientras que la temperatura mínima promedio fue en el mes de enero con 17.7 °C (Servicio Meteorológico Nacional, 2021). El 85.5 % de la superficie del estado posee clima cálido subhúmedo, el 14.5 % restante presenta clima seco y semiseco mismo que se localiza en la parte norte del estado. La península de Yucatán está localizada al norte 22°35'10", al sur 19°33'04" de latitud norte; al este 87°32'00", al oeste 90°24'26" de longitud oeste, presenta altas temperaturas medias anuales debido a la fuerza que ejercen las corrientes marítimas cálidas (Servicio Meteorológico Nacional, 2021).

1.1.9 Respuesta de las plantas para generar tolerancia al calor

Las plantas, al igual que otros organismos, pueden alcanzar estabilidad fenotípica a pesar de los cambios ambientales y variaciones genotípicas, proceso conocido como canalización (Jacob & Bendahmane, 2017). La capacidad de un genotipo para sobrevivir el estrés por calor dependerá

de la duración y severidad de este, así como, de la susceptibilidad de las células y etapa de desarrollo de la planta (Buchanan et al., 2015).

En plantas superiores, un incremento de 5°C sobre su temperatura óptima de crecimiento induce respuestas a estrés por calor, dentro de lo que se incluyen cambios en la organización de las estructuras celulares; organelos, citoesqueleto y funciones de la membrana plasmática junto con la disminución de síntesis de proteínas presentes en condiciones normales y la rápida transcripción y traducción de Heat shock proteins, la producción de hormonas como ácido abscísico, proteínas antioxidantes y demás moléculas de protección (Hatfield & Prueger, 2015).

El término o concepto de tolerancia a un determinado estrés hace referencia a la capacidad que tiene la planta de sobrevivir y recuperarse de fluctuaciones ambientales desfavorables. La respuesta ante un factor de estrés desencadena una fase inicial donde la planta activa mecanismos de defensa para hacer frente al estrés, si la planta no posee mecanismos adecuados o la intensidad del estrés supera la capacidad de respuesta de la planta, los daños son irreversibles y la planta muere. Los mecanismos de respuesta inducen cambios en el metabolismo celular para activar procesos de reparación de maquinaria celular dañada. Durante esta fase de resistencia, la planta alcanza un nuevo estado fisiológico que corresponde al grado máximo de resistencia que puede soportar, esta capacidad de resistencia se agota si el estado de estrés continúa por tiempos excesivos lo que conducirá a la muerte de la planta. Sin embargo, si la situación de estrés desaparece, las funciones biológicas de la planta pueden regenerarse alcanzando un nuevo estado fisiológico óptimo para las condiciones presentes (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

La respuesta de la planta ante condiciones ambientales desfavorables inicia con la percepción del estímulo estresante a través de diversos sensores ubicados en los compartimentos celulares (pared celular, membrana celular). Los cambios en la fluidez de la membrana, acumulación de Ca^{2+} citosólico, ROS, hormonas o enzimas antioxidantes desencadenan cascadas de señales activadas por reacciones de fosforilación llevadas a cabo por MAP-quinasas (de sus siglas en inglés, Mitogen Activated Protein) que a su vez activan distintos factores de transcripción, implicados en la respuesta a estrés, iniciando la expresión de genes y posterior traducción a proteínas de defensa (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

Las plantas perciben la información del ambiente de manera física como: intensidad de luz o temperatura y de forma química como: disponibilidad de agua o concentración de nutrientes.

Independientemente del tipo de señal, la planta percibe la información ambiental, así como, señales intercelulares en las proteínas receptoras. Dicha percepción resulta en un cambio en la actividad de la proteína receptora que, regula una vía de transducción de señales intracelulares. Algunas proteínas receptoras responden a la percepción de la señal activando quinasas intracelulares, que son enzimas que fosforilan proteínas. Esta fosforilación, generalmente, provoca un cambio alostérico en la proteína diana que puede cambiar su actividad para inducir un cambio en el comportamiento de la célula o en la señalización aguas abajo. Las interacciones dentro de una vía de transducción pueden conducir al movimiento de moléculas de señalización dentro de la célula mediante la liberación de una proteína de señalización de un complejo o la apertura de canales iónicos (Buchanan et al, 2015).

Varias vías de transducción regulan la síntesis o activación de factores de transcripción, proteínas que regulan la transcripción génica. Sin embargo, la expresión génica también está regulada a otros niveles y no todas las respuestas celulares van a requerir cambios en la actividad genética. De igual manera, algunas vías de transducción actúan sobre receptores de membrana o del citoplasma, lo que genera respuestas rápidas (Buchanan et al, 2015).

1.1.10 Generalidades de Heat Shock Protein, HSP.

El desplegamiento de proteínas es una de las respuestas reguladoras más conservadas en la biología, fue descubierta originalmente como respuesta ante el choque térmico, HSR (de sus siglas en inglés, Heat Shock Response) y por eso su nombre. Los 3 dominios biológicos (Archaea, Bacteria, Eucarya) sintetizan proteínas similares para proteger a las células contra el estrés abiótico. La mayoría de estas proteínas actúan como chaperonas reduciendo los niveles de proteínas mal plegadas, plegándolas nuevamente de manera correcta o degradándolas (proteasas) (Krebs et al., 2013).

A pesar de su nombre, algunas HSP están expresadas a lo largo del ciclo de vida de la planta y no son inducidas por calor. Sin embargo, debido a su homología de secuencia y funciones similares son definidas como HSP. Actualmente varios estudios intentan determinar las funciones de HSP y Hsf (de sus siglas en inglés, Heat shock factor) y su rol en la tolerancia a estrés en plantas (Buchanan et al., 2015). Por lo tanto, las proteínas HSP son esenciales para mantener la homeostasis celular en condiciones óptimas, así como, en condiciones de estrés (Wang et al., 2004).

Hace más de 50 años, Ritossa (1962) descubrió que HSP se acumulaban en *Drosophila melanogaster* como respuesta al choque térmico y desde ahí han sido identificadas en animales, humanos, plantas, hongos y microorganismos. Las proteínas HSP son altamente conservadas entre especies y organismos tanto eucariotas como procariotas. Como chaperonas moleculares, están involucradas en el plegamiento de proteínas nacientes, su ensamblaje y translocación o en el plegamiento correcto de proteínas desnaturalizadas proveyendo de citoprotección a la célula al replegar proteínas que han sido dañadas y modular las respuestas celulares inmunes (Buchanan et al., 2015; Asea et al., 2016). Actualmente se sabe que la inducción de la expresión de Hsp puede deberse a distintos tipos de estrés entre ellos: baja temperatura, radiación a la luz UV, sequía, reparación de heridas e inclusive por estrés biótico (Park & Seo, 2015).

1.1.11 HSP en respuesta al calor

La respuesta ante un incremento agudo de calor consiste en una reprogramación rápida y transitoria de la expresión génica, donde la síntesis de proteínas expresadas en condiciones normales se reduce mientras que transcripción y traducción de proteínas de choque térmico, HSP se acelera. Plantas con temperaturas de 5 °C por encima de sus condiciones óptimas de crecimiento muestran este tipo de respuesta (Buchanan et al, 2015).

Las plantas pueden adquirir tolerancia al calor si son sometidas a temperaturas no letales por un determinado número de horas antes de encontrarse con temperaturas letales. De la misma manera, la aclimatación puede ocurrir si el aumento de temperatura hacia temperaturas letales es gradual. Este proceso de aclimatación involucra la síntesis de HSP requeridas para mantener la homeostasis de proteínas. Este tipo de aclimatación rápida es transitoria y decae antes de las 24 horas (Buchanan et al., 2015).

1.1.12 Familia HSP

Existen 5 familias descritas para HSP de acuerdo con su peso molecular, homología de secuencia de aminoácidos, sus funciones y dominios: sHsp (15kDa a 42kDa), Hsp60, Hsp70, Hsp90 y Hsp100 (Figura 1.2) (Yan et al., 2020). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 58 genes que codifican para Hsp de los cuales 19 pertenecen a sHsp, 7 a Hsp60, 18 a Hsp70, 7 a Hsp90 y 8 a Hsp100.

Existen 3 dominios descritos para sHsp, un dominio α -cristalino de 90-100 aminoácidos con el motivo A-x-x-x-n-G-v-L altamente conservado al final del dominio. Posee, además, 2 regiones separadas por una región hidrofílica de longitud variable con los motivos Pro-X₍₁₄₎-Gly-Val-Leu y Pro-X₍₁₄₎-X-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile respectivamente. La región N-terminal es evolutivamente divergente y altamente variable en tamaño y secuencia y la región C-terminal corta y flexible con el motivo X-Ile/Val-X-Ile/Val al final de la extensión C-terminal (Figura 1.3). Se ha asociado al dominio α -cristalino con la interacción con proteínas desplegadas y la formación de dímeros. Sin embargo, este dominio por sí solo no es suficiente para la formación de estructuras u oligómeros de orden superior. De tal forma, que los dominios N-terminal y C-terminal facilitan la formación de oligómeros. La región N-terminal permite la unión del sustrato y la región C-terminal puede adoptar distintos ángulos a diferencia del dominio α -cristalino, lo que facilita el ensamblaje de oligómeros con diferentes geometrías (Asea, A et al., 2016; Waters et al., 2020).

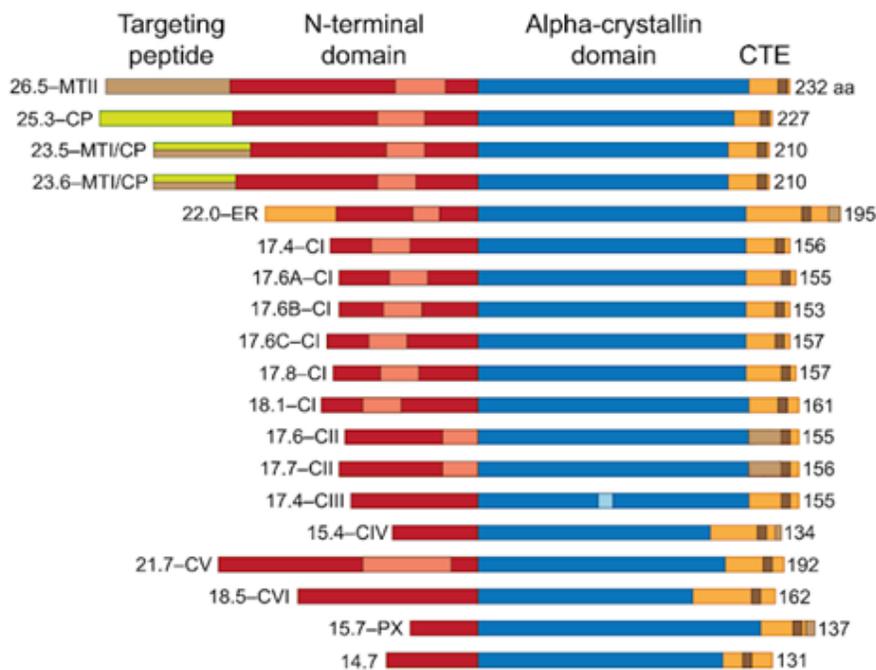


Figura 1.3. Dominios conservados (N-terminal, α -cristalino y C-terminal) en las secuencias de la familia sHSP en *Arabidopsis thaliana*.

Adicionalmente, se ha demostrado su función durante el desarrollo de la planta, por ejemplo, en el desarrollo del polen en *Zea mays*, *Lilium* y *Nicotiana tabacum*, maduración de la semilla en *Pisum sativum*, *Glycine max* y *Medicago sativa*, desarrollo del embrión en *Arabidopsis thaliana*, germinación de la semilla en *Pisum sativum*, *Arabidopsis thaliana*, y *Hordeum vulgare*. Adicionalmente, sHsp también se expresan normalmente durante ciertos estadios, como la

floración. Sin embargo, no todos los miembros de la familia sHsp se expresan durante el desarrollo (Asea et al., 2016).

Se demostró que la sobreexpresión de *Oshsp17.0* y *OsHhsp23.7* en arroz no solo incrementó el vigor de la semilla, sino que también ayudó a que estas germinaran bajo condiciones de estrés por sequía y salinidad (Zou et al., 2012). De la misma manera, las semillas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban *Tahsp26* de trigo, fueron capaces de germinar bajo condiciones de estrés por calor continuo a 35 °C (Asea et al., 2016).

La sobre expresión de *Pthsp17.8* de *Populus trichocarpa* en *Arabidopsis* contribuyo a una mayor tasa de supervivencia de las plantas ante estrés por calor (45 °C, 2-3 horas), así mismo las actividades de enzimas antioxidantes POD (peroxidasa), CAT (catalasa) y SOD (superóxido dismutasa) y osmolito como prolina, se incrementaron en la variedad transgénica (Li et al., 2016). De igual forma, la sobre expresión de *Rchsp17.8* de *Rosa chinensis* en tabaco confirió mayor tolerancia a calor en las variedades transgénicas, así como un aumento en el contenido de prolina y del gen P5CS, involucrado en la regulación de la síntesis de prolina (Jiang et al., 2020)

1.1.12.2 HSP60

Chaperoninas o HSP60 fueron las primeras proteínas definidas como chaperonas moleculares. Están presentes en el citoplasma, matriz mitocondrial y en los estromas de los cloroplastos, comparten una estructura de 2 anillos de siete miembros que requieren ATP para su función. Poseen un dominio apical de unión al sustrato, un dominio ecuatorial o sitio de unión al ATP y el dominio intermediario que permite la rotación de los otros dos dominios para el plegamiento de proteína (Bukau & Horwich 1998).

Al estar encargadas del ensamblaje y plegamiento de proteínas se expresan normalmente bajo condiciones normales. En plantas, Hsp60 está involucrada en el ensamblaje de rubisco. También evitan la formación de agregados de proteínas a temperaturas fisiológicamente relevantes, pero su expresión no aumenta ante estrés por calor (Buchanan et al., 2015).

A temperatura óptima Hsp60 ayuda a las proteínas recién sintetizadas a alcanzar sus formas nativas, al unir y facilitar su plegamiento dentro del canal de cada anillo al exponer un revestimiento hidrofóbico flexible que probablemente une proteínas no-nativas a través de superficies hidrofóbicas expuestas, una vez dentro, quedaran encerradas en el interior del anillo

en su estado nativo. Por otro lado, el estado de plegamiento se activa por cambios conformacionales de la proteína, inducidos por la unión del ATP (Bukau & Horwich, 1998).

1.1.12.3 Hsp70

Los genes Hsp70 pueden expresarse tanto durante el desarrollo normal de planta, así como, bajo condiciones de estrés abiótico y biótico (Asea, et al., 2016). Asisten en el ensamble, plegamiento y replegamiento de proteínas, previenen la agregación de proteínas y facilitan la degradación de proteínas inestables (Guo et al 2016).

Son chaperonas ATP dependientes y las más conservadas dentro de la familia Hsp. Existen varios miembros de Hsp70 según la especie de planta, *Arabidopsis* posee 18, *Populus trichocarpa* 20, *Oryza sativa* 32 y *Glycine max* posee 61. Tienen un dominio ATPasa N-terminal de ~44 kDa, un dominio de unión al sustrato de ~18 kDa con una región C-terminal variable de ~10 kDa. Debido a su alta homología de secuencia y estructura, Hsp110 se incluyen dentro de la familia Hsp70 (Guo et al 2016). El dominio N-terminal ejerce un rol regulatorio, mientras que el dominio de unión al sustrato se une de forma transitoria a las regiones hidrofóbicas de los aminoácidos que están expuestos en las proteínas no-nativas. La conformación nativa de los sustratos se alcanza a medida que pasa por ciclos de unión y liberación guiados por los cambios entre los estados de baja afinidad (unión al ATP) y de alta afinidad (unión al ADP) con el ciclo de ATPasa regulado por proteínas DnaJ (Hsp40) que actúan como co-chaperonas de Hsp70 (Asea et al., 2016; Guo et al., 2016). De acuerdo con su localización subcelular se divide en 4 subfamilias con motivos altamente conservados en la región C-terminal de cada subfamilia, así el motivo EEVD corresponde al citosol, HDEL al retículo endoplasmático, PEAEEYEEAKK a la mitocondria, y el motivo PEGDVIDADFTDSK a los cloroplastos (Guo et al 2016).

La expresión de Hsp70 también se ha asociado con factores de crecimiento y desarrollo de las plantas. En *Medicago sativa* se sugirió que Hsp70 puede ocupar un papel importante en el desarrollo de nódulos. De la misma forma, knockout de *Arabidopsis* de *AtHsc70-1* en condiciones normales exhibieron malformación de hojas y deterioro del crecimiento de las raíces (Buchanan et al., 2015).

Dentro de su papel como chaperona que responde ante estrés por calor existen varios estudios que demuestran que su sobreexpresión confiere termotolerancia en plantas. Por ejemplo, las plántulas de *N. tabacum* que sobre expresaban su gen Hsp70-1, crecieron mejor después de ser sometidas a temperatura (45 °C; 2 h). Así mismo, la sobre expresión de Hsp70 mitocondrial en

O. sativa sobre el mismo modelo vegetal promovió la tolerancia a calor (48°C; 15 min) (Grover et al., 2013).

1.1.12.4 Hsp90

Como chaperona participa en el ensamblaje, maduración y estabilización de moléculas de señalización como cinasas, receptores de hormonas y factores de transcripción. Al igual que Hsp70, Hsp90 está presente en el citoplasma, mitocondria, cloroplastos y retículo endoplasmático. Si bien responde ante estrés por calor, su expresión también se incrementa ante una privación de nutrientes en la célula, alteración en el pH fisiológico, heridas, radiación UV e infecciones virales y bacterianas. Posee los dominios N-terminal y C-terminal unidos por una región cargada de longitud variable (Krishna & Gloor 2001).

Los patrones de expresión de Hsp90 varía dependiendo del tejido por lo que se especula que cada isoforma puede realizar un papel específico durante el crecimiento y desarrollo de la planta, así como, durante condiciones adversas. En *Arabidopsis* la isoforma de Hsp90 del citoplasma, AtHsp90.1, se detectó solo en las raíces mientras que la isoforma AtHsp90.2 estuvo presente en todos los tejidos. De la misma forma, la expresión de AtHsp90.1 está altamente inducida por elevadas temperaturas, en comparación con AtHsp90.2, AtHsp90.3 y AtHsp90.4 mostraron estar constitutivamente expresadas con un ligero incremento después del estrés térmico (Asea et al., 2016). En *Nicotiana benthamiana* se describieron 4 isoformas de Hsp90. La expresión de NbHsp90.2 y NbHsp90.3 era inducida por calor. Por otra parte, NbHsp90.1 y NbHsp90.4 están constitutivamente expresadas, lo que sugiere que su función está relacionada con mantener la homeostasis celular. El silenciamiento de NbHsp90.1 causó fenotipos atrofiados por lo que se relaciona a esta isoforma con el correcto crecimiento de la planta (Kanzaki et al., 2003).

1.1.12.5 Hsp100

Las Hsp100 o también llamadas proteínas AAA+ (de sus siglas en inglés ATPasa Associated with celular Activities) están encargadas de desmontar los agregados de proteínas que se forman a causa de un determinado estrés o cambio fisiológico, por ello también cumplen funciones en la regulación del ciclo celular, tráfico intracelular, regulación de genes y transposición del ADN. Se encuentran en el citoplasma, mitocondria y cloroplasto (Buchanan et al., 2015). Posee el dominio conservado N-terminal, esencial para la interacción con el sustrato que son, generalmente, agregados y 1 o 2 dominios de unión a nucleótidos, NBDs (nucleotide-binding domains, por sus siglas en inglés), los cuales poseen afinidad para el ATP o ADP. Las proteínas que poseen 2

NBD funcionan como hexámeros en presencia de ATP, mientras que las que poseen un NBD son más pequeñas. Aun así, todas las Hsp100 tienen estructura en forma de anillo cuyos cambios conformacionales son influenciados por la unión del ATP (Asea et al., 2016).

En plantas transgénicas de *N. tabacum* que expresaban Hsp100 de *O. sativa* se observó mayor supervivencia ante estrés térmico (50°C; 50 min) en comparación con las plantas control. Así mismo, transformantes de *O. sativa* que expresaban Hsp100 de *A. thaliana* evidenciaron un mejor crecimiento durante la fase de recuperación ante el estrés por calor (45 °C por 3 h, 47 °C por 2 h, 50°C por 40 min) (Grover et al., 2013).

1.1.13 Interacción HSF-HSP

El incremento de temperatura se percibe por sensores de calor, uno de ellos es el canal de calcio que inicia un flujo de Ca^{2+} al interior de la célula, así mismo se ha asociado a una variante de histona H2A.Z como sensor de calor. Las señales pueden ser transmitidas por quinasas CDPKs (the calcium-dependent protein kinase, por sus siglas en inglés), MAPKs (mitogen-activated protein kinase, por sus siglas en inglés) o mensajeros secundarios como Ca^{2+} , H_2O_2 y NO. La unión de HSF al ADN podría desencadenarse por vías dependientes de Ca^{2+} /Calmodulina. Así mismo H_2O_2 y NO pueden influir en la respuesta al choque térmico en el nivel de HSF a través de la vía de Ca^{2+} /Calmodulina (Saidi et al., 2011).

Los factores de choque térmico, HSF (de sus siglas en inglés Heat, Shock Factor) son los principales inductores de HSP. Se han descrito 3 clases de HSF: A, B y C. Dentro de las familias de HSF, HSFA1, HSFA2 y HSFB1 han sido de los más estudiados en plantas. HSFA1 está expresado constitutivamente y funciona como regulador maestro ante la respuesta al estrés por calor. Cuando existe estrés térmico HSFA1 se retiene en el núcleo, lo que conduce a la expresión de HSFA2 y HSFB1 y la formación de complejos proteicos entre HSFA1 y HSFA2. Cuando el estrés disminuye HSFA1 se redistribuye en el citoplasma, mientras que HSFA2 se mantiene inactivo por interacción con sHSP17. Por su lado, la acumulación de HSFB1 es transitoria y los niveles de esta proteína disminuyen de manera rápida durante la fase inicial de HSR. Los miembros de la clase B no pueden activarse por sí mismos (Hahn et al., 2011).

En condiciones normales, HSF existe como monómero asociado a HSP70 en el citoplasma, incapaz de unirse al ADN y comenzar la transcripción. Sin embargo, durante un episodio de estrés por calor HSP70 se disocia de HSF, ingresa al núcleo y se trimeriza (Figura 1.4). Una vez en su forma activa, los trímeros de HSF contienen un dominio conservado de unión al ADN en la

región N-terminal que puede reconocer y unirse al motivo 5'-nGAAnnTTCn-3' de los elementos de choque térmico, HSE (de sus siglas en inglés Heat Shock Elements) ubicados en las regiones promotoras de los genes HSP, donde se fosforilan y activan la transcripción de ARNm de HSP, llevando a la traducción de HSP. HSP70, consecuentemente se une a los trímeros de HSF que están unidos a los HSE. El complejo HSP70/trímeros se disocia de los HSE, desmontándose y desfosforilándose en monómeros de HSF, los mismos que se unirán de nuevo a Hsp70 reformando el complejo HSP70/HSF monómeros presente en ausencia de estrés (Taiz & Zeiger 2002; Tian et al., 2021). Por lo tanto, por la acción de HSF, las HSP se acumulan hasta que son lo suficientemente abundantes para unirse a los trímeros de HSF y detener la transcripción de ARNm de HSP (Taiz & Zeiger, 2002).

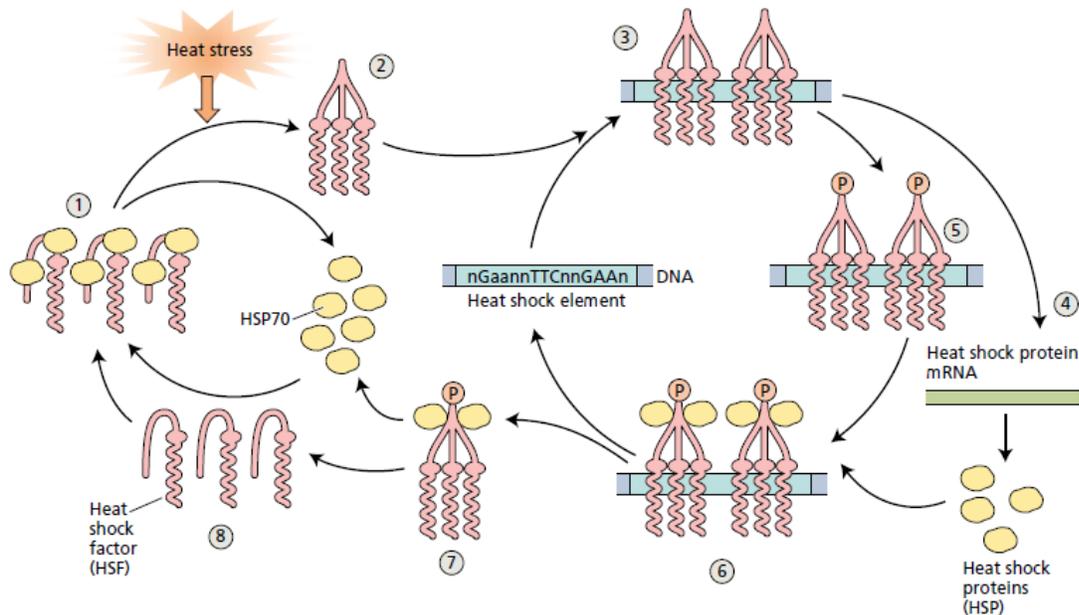


Figura 1.1. Modelo de interacción HSF-HSP70 en respuesta a estrés por alta temperatura. 1, complejo entre monómeros HSF y HSP70. 2, cuando existe estrés por calor los monómeros HSF se trimerizan. 3, Ingresan al núcleo y se unen al ADN. 4 y 5, inician la transcripción de proteínas HSP. 6 y 7 cuando HSP70 es abundante, se une a los trímeros de HSF fosforilados, separándose del ADN. 8, en el citoplasma los trímeros de HSF se desfosforilan y se separan de HSP70. De nuevo los monómeros HSF forman el complejo HSF-HSP70, en ausencia de estrés (Taiz & Zeiger, 2002).

HSP70 funciona como un complejo proteico junto con otras chaperonas como HSP90 y HSP110. Un estudio realizado en tomate (*Solanum lycopersicum*), demostró que existe diafonía entre HSP70 y HSP90 al regular la unión de HSF a los HSE (Hahn et al., 2011). El modelo sugiere que cuando existe estrés por calor las proteínas termolábiles comienzan a desnaturalizarse en el citosol, lo que reclutará al complejo HSP70/HSP90 dejando a HSFA1 para desencadenar respuesta al calor (Figura 1.5). Un exceso de HSP70/90 favorecerá la inactivación de HSFA1 y

la actividad de represión de HSF. Sin embargo, la regulación de HSF y HSP es altamente compleja y puede no ser siempre un efecto de concentraciones, sino también de un proceso que está finamente ajustado (Bourgine et al., 2021; Jacob et al., 2017). En *Arabidopsis*, la actividad de HSFA2 está regulada por ROF1 y ROF2 de manera tanto positiva como negativa al interactuar con HSP90. La proteína ROF1 forma un complejo con HSP90 que co-importa a HSFA2 al núcleo y la mantiene en un estado transcripcionalmente activo mientras que la unión de ROF2 con HSFA2 inhibe su actividad. ROF2, inducible por calor, ingresa al núcleo y se heterodimeriza con ROF1 en el complejo ROF1/HSP90 resultando en la inhibición de HSFA2 (Jacob et al., 2017; Tian et al., 2021). Adicionalmente, estudios demostraron que la prevención de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana condujo a la ausencia de HSR. Así mismo el tratamiento con inhibidores de HSP90 indujeron una menor respuesta a calor a temperatura basal, sin embargo, se puede obtener una HSR completa a temperaturas más altas. Esto sugiere que además de la disociación de HSP90 de HSFA1, este último requiere ser activado de manera independiente por una señal aún no aclarada que depende estrictamente de la entrada de calcio a través de la membrana plasmática (Bourgine & Guihur, 2021).

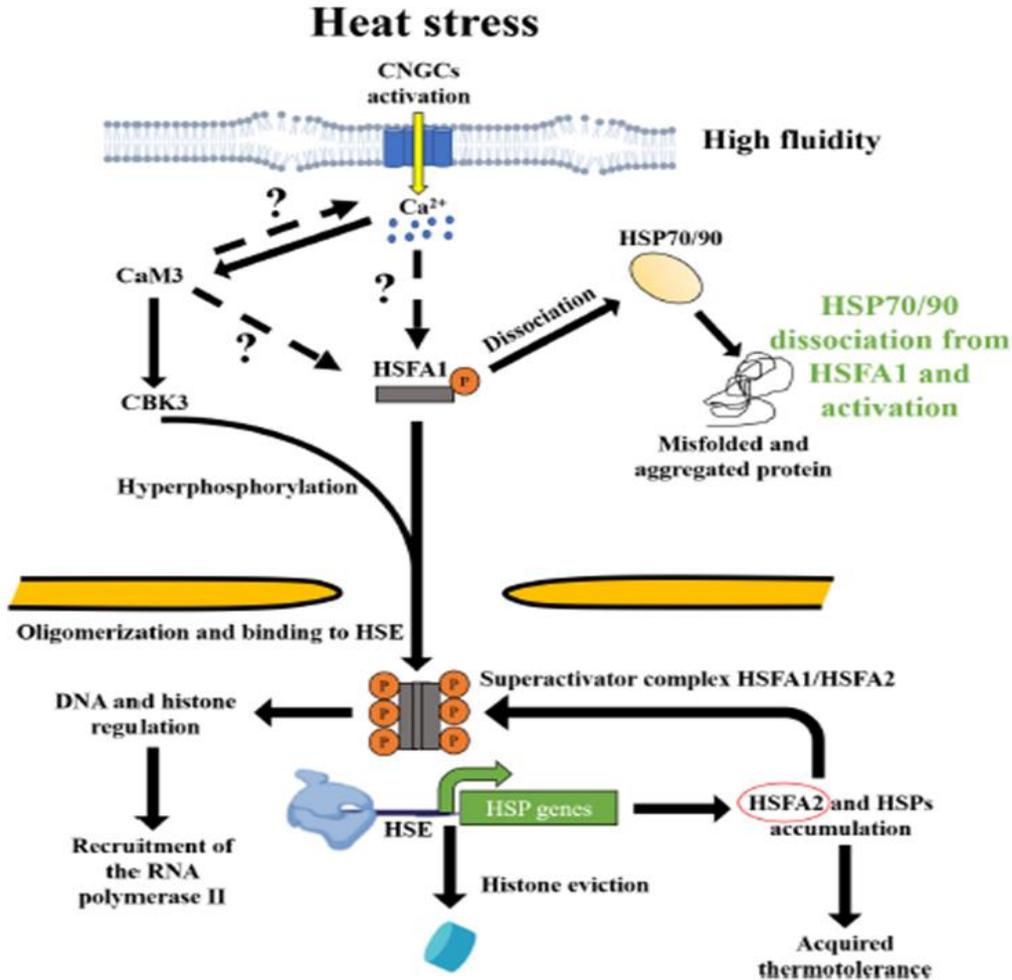


Figura 1.2. Percepción del calor y mecanismos que inducen termotolerancia. Durante estrés por alta temperatura, cambios en la fluidez de la membrana activa sensores de calor, CNGC (cyclic nucleotide-gated channels, por sus siglas en inglés) que activan HSFA1. Las proteínas desnaturalizadas por el calor reclutan HSP90 y HSP70. La disociación de HSP70-90 permite la hiperfosforilación de HSFA1 para su translocación al núcleo y unión al ADN. HSFA1 puede mediar señales que remuevan las histonas unidas a los genes HSP. Finalmente, la ARN polimerasa II iniciará la transcripción de *hsfa2*, formando un complejo super activador HSFA1-HSFA2 para la transcripción de *hsf* (Bourgine & Guihur, 2021).

Adicionalmente, un estudio realizado en *Populus trichocarpa* señala las posibles vías reguladoras o de interacción entre genes HSF y HSP (Figura 1.6). En donde se identifica una estrecha relación entre Hsp90 y HsfA2 lo que es consistente con las interacciones de proteína encontradas en tomate y *Arabidopsis*. Esto podría sugerir que la respuesta a estrés por calor, HSR, mantiene mecanismos similares entre las especies de plantas. Sin embargo, hace falta más estudios para determinar si existen mecanismos de regulación específicos HSF-HSP de acuerdo con cada especie de planta (Tian et al., 2021).

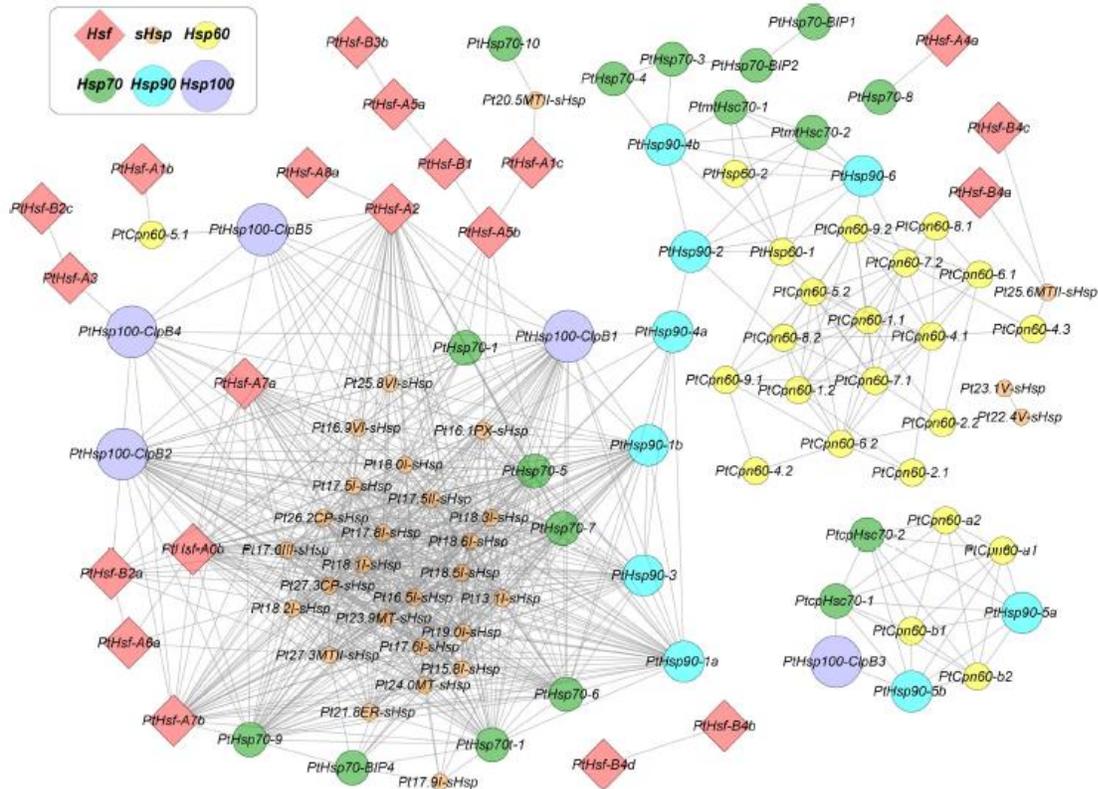


Figura 1.3. Vías de interacción entre genes *hsf* y *hsp* en *Populus trichocarpa*. Los nodos representan genes *hsf* y *hsp*, mientras que las líneas constituyen la interacción de coexpresión. Los códigos de color representan cada familia de genes. Los diamantes rojos corresponden a *hsf*, mientras que los círculos sólidos naranja, amarillo, verde, turquesa y púrpura indican *shsp*, *hsp60*, *hsp70*, *hsp90*, *hsp100* respectivamente (Tian et al., 2021).

1.2 JUSTIFICACIÓN

El aumento de temperatura asociado al calentamiento global provoca efectos adversos en la fisiología y desarrollo de plantas que a su vez afecta su rendimiento y con ello la red alimentaria. Ante esto surgen nuevas estrategias para incrementar la producción, en las que se incluyen; manejo fitosanitario de patógenos, programas de capacitación para buenas prácticas agrícolas y de manufactura, entre otras.

La naturaleza sedentaria de las plantas constantemente las expone a cambios climáticos extremos. Sin embargo, han desarrollado mecanismos de respuesta que son el resultado de cambios evolutivos a nivel morfológico y fisiológico que les ha permitido sobrevivir en condiciones adversas. Por lo que, resulta necesario entender cómo las plantas responden a elevadas temperaturas y activan tales mecanismos para que las ciencias de las plantas avancen y poder

hacer frente a las variaciones fluctuantes de temperatura que comprometen el rendimiento de los cultivos y con esto la seguridad alimentaria.

A partir de esto, las herramientas biotecnológicas han permitido el estudio de genes involucrados en respuesta a estrés abiótico y con esto la creación de variedades tolerantes. HSP son chaperonas moleculares que si bien, pueden estar expresadas constitutivamente, se ha demostrado que responden al aumento de temperatura al evitar que plegamientos incorrectos y agregados de proteínas se formen. De acuerdo con la revisión bibliográfica, una de las sHSP que responde a calor es HSP17.8. Así mismo, el modelo de interacción sugiere la acumulación de HSP70 y HSP90 para proteger a las proteínas desnaturalizadas por altas temperaturas.

Ante la importancia agronómica de *Carica papaya* y al no existir estudios sobre la expresión de la familia Hsp registrados por estrés térmico, se propone, evaluar el efecto del incremento de temperatura en dos genotipos de papaya sobre la fisiología y la expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70*, *hsp90* comenzando con una caracterización *in silico* de la familia para, posteriormente, seleccionar genes candidatos que podrían conferir tolerancia al calor y analizar su expresión en respuesta a altas temperaturas.

1.3 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuántos genes de la familia *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* existen en el genoma de *Carica papaya* L. a partir de sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana*?
2. ¿Existen diferencias en la respuesta fisiológica ante estrés por alta temperatura entre *C. papaya* cv Maradol y silvestre?
3. El genotipo silvestre de papaya, al ser una especie no domesticada, y, por lo tanto, con mejores rasgos tolerantes ante estrés abiótico ¿podría presentar mayor expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* o *hsp90* en comparación con su cultivar comercial? ¿La diferencia de expresión podría estar relacionada con las respuestas fisiológicas distintas de estos genotipos ante un estrés por alta temperatura?

1.4 HIPÓTESIS

1. Existen secuencias homólogas de genes que codifican para HSP17.8, HSP70 y HSP90 de *A. thaliana* en el genoma de *C. papaya* al ser proteínas altamente conservadas entre especies.

2. Existen diferencias en la respuesta fisiológica entre *C. papaya* cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura.
3. El genotipo silvestre podría presentar mayor expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* o *hsp90* que ayudan a la planta a generar tolerancia a altas temperaturas en comparación con su cultivar Maradol. Además, la diferencia de expresión podría estar relacionada con las respuestas fisiológicas distintas de estos genotipos ante estrés por alta temperatura.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo General

Analizar la respuesta fisiológica y la expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70*, *hsp90* al someter plantas de *Carica papaya* cv Maradol y silvestre a condiciones de estrés por choque térmico, para determinar genes candidatos que puedan conferir tolerancia a altas temperaturas.

1.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, *in silico*, la estructura y filogenia de la familia de genes que codifican para HSP17.8, HSP70, HSP90 en *Carica papaya* L cv SunUp a partir de los genes ortólogos del genoma de *Arabidopsis thaliana*.
- Evaluar, a nivel fisiológico, el efecto de la exposición a estrés por alta temperatura en dos genotipos de *C. papaya* (Maradol y silvestre).
- Evaluar los niveles de expresión de *hsp17.8*, *hsp70*, *hsp90* en plantas de *C. papaya* cv Maradol y silvestre en respuesta a estrés por alta temperatura y al finalizar la etapa de recuperación a dicho estrés.

1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el presente trabajo de tesis, éste se repartirá en 3 áreas (bioinformática, análisis fisiológico y análisis de expresión génica) dividida en 5 capítulos. El capítulo I consistió en la revisión de literatura científica y estado del arte del tema propuesto junto con la búsqueda de secuencias de posibles genes candidatos. El capítulo II, consistió en el análisis *in silico* de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* en *Carica papaya* cv SunUp a partir de sus homólogos de *A. thaliana* y diseño de oligonucleótidos específicos. En el capítulo III, se realizó el análisis fisiológico para cuantificar la respuesta de las plantas ante estrés por alta temperatura. Finalmente, el capítulo IV detalla el perfil de expresión de los genes *Cphsp17.8*, *Cphsp70* y

Cphsp90 en condiciones normales, condiciones de estrés y recuperación de 7 días. Todos los análisis se realizaron en 2 genotipos de *Carica papaya* cv Maradol y silvestre (Figura 1.7)

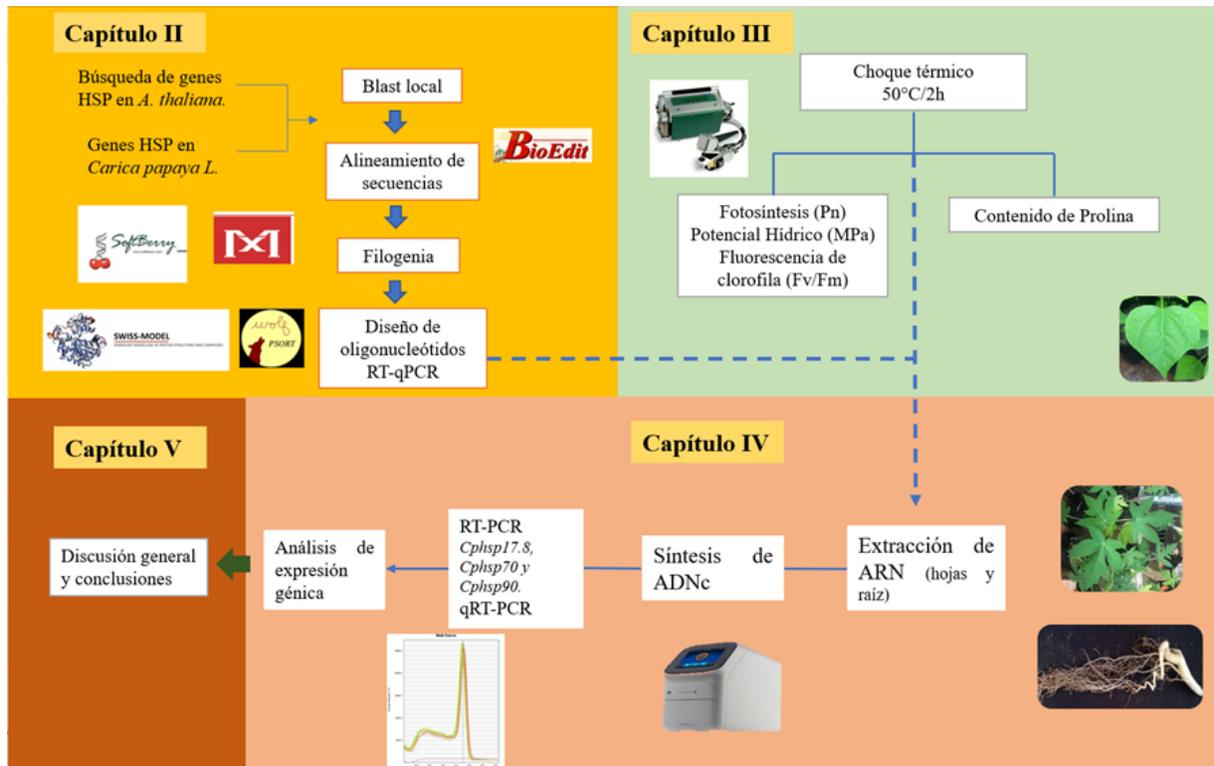


Figura 1.7. Estrategia experimental de la tesis “Caracterización y análisis de la expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* en respuesta a estrés por calor en *Carica papaya* cv Maradol y silvestre”. El capítulo II constituye la parte bioinformática del trabajo. El capítulo III, se enfoca en el análisis fisiológico. El capítulo IV, hace referencia al análisis de expresión de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90*. Finalmente, el capítulo V presenta la discusión general de resultados y conclusiones.

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN *in silico*, FILOGENIA Y ESTRUCTURA DE GENES QUE CODIFICAN PARA HEAT SHOCK PROTEINS EN *Carica papaya* cv. SunUp

2.1 INTRODUCCIÓN

Debido a su alto valor nutritivo *C. papaya* es ampliamente cultivada en Centroamérica, Suramérica, Australia, Tailandia y Malasia. El tamaño de su genoma es de 372Mb, posee 9 pares de cromosomas y es diploide. El cultivo prevalece en suelos fértiles, bien drenados con pH entre 5.5-6.5. De igual manera, nutrientes como el nitrógeno (N) y fósforo (P) son esenciales para asegurar un crecimiento óptimo de follaje, troncos y raíces induciendo una mayor productividad y rendimiento. Por otra parte, el mejoramiento de la papaya ha producido cultivares con características agronómicas deseadas como, forma, tamaño y dulzura del fruto (Chávez-Pesqueira et al., 2017).

Sin embargo, la papaya está constantemente expuesta a factores bióticos como, el virus de la mancha anular y factores abióticos entre ellos, altas temperaturas, estrés hídrico o estrés por salinidad que reducen el rendimiento del cultivo. La mejora de cultivos, a través de ingeniería genética se ha vuelto un paso importante para obtener variedades que superen las limitaciones del cambio climático y enfermedades por patógenos. Actualmente, las tendencias de mejora genética consisten en la integración de enfoques ómicos (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y fenómica) junto con análisis bioinformáticos (Zainal-Abidin et al., 2021).

La combinación de enfoques ómicos y bioinformáticos para los programas de mejoramiento genético permite una comprensión holística de las bases genéticas del cultivo, para, de esta forma, entender las interacciones moleculares entre genes, proteínas y metabolitos. El genotipo SunUp fue el primer genoma de papaya secuenciado, con 27793 transcritos codificantes de proteínas. Actualmente, este genoma se ha utilizado como referencia para análisis genómicos, búsqueda de marcadores moleculares, mapas físicos y genéticos que han permitido la búsqueda de genes de interés para mejorar las características deseadas de la papaya (Zainal-Abidin et al., 2021).

Hasta el momento no existen estudios que caractericen HSP17.8, HSP70 y HSP90 en *Carica papaya*. Por esta razón se llevó a cabo un análisis *in silico* de los genes que codificaban para estas Heat Shock Proteins con la finalidad de obtener secuencias candidatas de genes en

respuesta a estrés por calor, cuya sobre expresión pudiera conferir tolerancia a temperaturas extremas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Búsqueda de secuencias *hsp* de *Carica papaya* a partir de sus genes ortólogos en *Arabidopsis thaliana*

Las secuencias que codifican para HSP17.8, HSP70 y HSP90 de *A. thaliana* se obtuvieron según los números de acceso de la base de datos, National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y The Arabidopsis Information Resource (TAIR: <https://www.arabidopsis.org/>) reportados por Waters., et al (2020), Lin et al., (2001) y Krishn., et al (2001) respectivamente. Adicionalmente, la secuencia HSP17.8 de *P. trichocarpa* se obtuvo de la base de datos PopGenie: <https://popgenie.org/> reportada por Li., et al (2016).

Para la búsqueda de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* en *C. papaya* cv. SunUp se realizó un blast local directamente en el genoma de papaya (Taxid:3349) a través del programa BioEdit V.7 Sequence Alignment Editor utilizando como programa BLASTN. Se utilizó como blanco (query) las secuencias *hsp* de *A.thaliana* y *P.trichocarpa* con los siguientes parámetros: expectation value (E): 1×10^{-14} , número máximo de hits a reportar: 500, número máximo de alineamientos a mostrar: 250, matriz de sustitución: BLOSUM62.

2.2.2 Análisis y alineamiento de secuencias proteicas de genes *hsp* de *A.thaliana* y *C.papaya*

Las secuencias de genes *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* de *C. papaya* obtenidas según los parámetros descritos anteriormente se tradujeron a los posibles marcos de lectura abiertos a través del software bioinformático Softberry: <http://www.softberry.com/> con el programa FGENESH. Para obtener el peso molecular y punto isoeléctrico de cada proteína HSP de *C. papaya* se utilizó el software EXPASY, con el programa Compute pI/Mw: <https://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>. Por otra parte, la localización subcelular de las proteínas se predijo utilizando el programa WoLF PSORT: <https://wolfpsort.hgc.jp/>.

A partir de las secuencias proteicas obtenidas, cada familia HSP se alineó con el software MEGA11 utilizando el algoritmo ClustalW sin modificar los parámetros establecidos por el programa. El alineamiento se exportó en formato FASTA y se utilizó el programa BioEdit V.7 para el análisis de dominios de HSP17.8, HSP70 y HSP90.

Para comprender mejor las características estructurales de las proteínas se realizó la búsqueda de motivos conservados con el software MEME: <https://meme-suite.org/meme/> a partir de las secuencias proteicas de HSP de *C. papaya*, bajo los siguientes parámetros: número de repeticiones = cualquier número de repeticiones, ancho de motivo mínimo = 6, ancho de motivo máximo = 50 y el número de motivos a encontrar = 20, para los demás parámetros se mantuvieron los valores predeterminados.

2.2.3 Análisis filogenético y selección de proteínas HSP de *C. papaya* a partir de genes ortólogos de *A. thaliana*

Para el análisis filogenético se utilizaron las secuencias proteicas de cada familia HSP de *C. papaya* y *A. thaliana* las cuales se alinearon según lo descrito previamente. La construcción filogenética de cada familia HSP se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximun Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó *LG model* con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5, los demás parámetros se mantuvieron según el programa.

2.2.4 Divergencia evolutiva de proteínas HSP

La distancia evolutiva entre secuencias HSP de *A. thaliana* y *C. papaya* se realizó a nivel proteico para lo cual se utilizó el método Bootstrap con 100 réplicas y el modelo *p-distance* aplicando la fórmula $p = (1-q) * 100$.

2.2.5 Modelaje tridimensional de proteínas HSP17.8, HSP70 y HSP90 de *C. papaya*

El modelaje de proteínas se realizó a las secuencias seleccionadas a partir del análisis filogenético a través de la plataforma Swiss Model: <https://swissmodel.expasy.org/>. Adicionalmente se comparó los modelos obtenidos de *C. papaya* con las estructuras tridimensionales de HSP70, HSP90, sHSP de *A. thaliana*.

2.2.6 Diseño de oligonucleótidos de genes *Cphsp* de *C. papaya* L.

El diseño de oligonucleótidos se realizó para las secuencias seleccionadas de *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* de *C. papaya* cv Sun up con el software Primer Express V3.0. Adicionalmente, los oligonucleótidos se analizaron en el programa OLIGOANALYZER: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> para identificación de posibles dímeros, porcentaje de CG, temperatura de melting, entre otros. Se procuró mantener los siguientes

parámetros: %CG entre 40-60%, longitud del oligonucleótido entre 18-22 pares de bases (pb), temperatura de melting con diferencia $<1^{\circ}\text{C}$, longitud del producto de PCR entre 100-150 pb.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Búsqueda de secuencias *hsp17.8*, *hsp70* y *hsp90* de *C. papaya* a partir de genes homólogos de *A.thaliana*

Al no existir reportes o una base de datos que clasifique a cada familia Heat Shock Protein de *C. papaya*, se toma como punto de referencia a las secuencias Hsp descritas para la planta modelo *A.thaliana* y, de esta forma, encontrar sus genes ortólogos en papaya.

Según los antecedentes, dentro de la familia sHSP, HSP 17.8 ha sido reportada por su respuesta ante estrés por calor (Jiang et al., 2009; Li et al., 2016; Jiang et al., 2020). Al realizar la búsqueda dentro de familia sHSP de *A. thaliana* se encontró una sola secuencia *hsp17.8* reportada por Waters et al., (2021). Adicionalmente, se toma como referencia la secuencia *hsp17.8* de *P. trichocarpa* que, según lo describe Li (2016), responde ante estrés por alta temperatura (tabla 2.1). Ambas proteínas han sido localizadas en el citoplasma.

Tabla 2.8. Secuencias correspondientes a *hsp17.8* obtenidas, según su número de accesión, de la base de datos TAIR y PopGenie, junto con su localización celular.

Especie	Número de accesión	Localización
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G07400	Citoplasma
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.009G049800.1	Citoplasma

Con las secuencias descritas en la tabla 1.2, se procedió a realizar un blastn local en el genoma codificante de *C. papaya* cv SunUp. Finalmente, se encontraron 5 posibles genes en común, de papaya que codifican para HSP17.8 con porcentajes de identidad altos entre 79% (*Cphsp17.8-2* y 4) y 83% (*Cphsp17.8-1* y 2) con *Populus* y *Arabidopsis* respectivamente y valor esperado (E) entre 1E^{-31} y 7E^{-42} (tabla 2.2). Las secuencias encontradas, pertenecientes a *C. papaya* se nombraron para este estudio como *Cphsp17.8-1* al 5.

Tabla 9.2. Secuencias *hsp17.8* de *C. papaya* obtenidas a partir de sus genes ortólogos de *A. thaliana* y *P. trichocarpa*. Se presenta su valor esperado (E) y el porcentaje de identidad.

Query	Nombre	Gen	Score	Valor (E)	% Identidad
AT1G07400	<i>Cphsp17.8-1</i>	evm.model.supercontig_81.28 pacid=16426941	86	7E-42	83
	<i>Cphsp17.8-2</i>	evm.model.supercontig_81.30 pacid=16426944	81	7E-39	83
	<i>Cphsp17.8-3</i>	evm.model.supercontig_3.462 pacid=16416771	79	1E-37	82

	<i>Cphsp17.8-4</i>	evm.model.supercontig_81.41 pacid=16426956	69	1E-31	81
	<i>Cphsp17.8-5</i>	evm.model.supercontig_81.45 pacid=16426960	77	2E-36	81
Potri.009G049800.1	<i>Cphsp17.8-1</i>	evm.model.supercontig_81.28 pacid=16426941	58	2E-25	80
	<i>Cphsp17.8-2</i>	evm.model.supercontig_81.30 pacid=16426944	49	4E-20	79
	<i>Cphsp17.8-3</i>	evm.model.supercontig_3.462 pacid=16416771	74	5E-35	80
	<i>Cphsp17.8-4</i>	evm.model.supercontig_81.41 pacid=16426956	58	2E-25	79
	<i>Cphsp17.8-5</i>	evm.model.supercontig_81.45 pacid=16426960	58	2E-25	80

Según lo reportado por Lin et al., (2001) existen 18 genes que codifican para HSP70 en *A. thaliana* localizadas en el citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, mitocondria o cloroplasto con diferentes niveles de expresión ante altas temperaturas (tabla 2.3). Así mismo, los genes descritos como *Athsp70-14*, *Athsp70-15*, *Athsp70-16* y *Athsp70-17* pertenecen a la subfamilia HSP110 que codifican proteínas con firmas HSP70.

Tabla 2.10. Secuencias correspondientes a *hsp70* de *A. thaliana* obtenidas, según su número de accesoión, de la base de datos NCBI. Se presenta su número de accesoión, localización celular y niveles de expresión.

Gen	Número de accesoión	Localización	Expresión
<i>Athsp70-1</i>	CAB85987	Citoplasma/Núcleo	C*, I*
<i>Athsp70-2</i>	CAB85986	Citoplasma/Núcleo	C, I
<i>Athsp70-3</i>	AAF14038	Citoplasma/Núcleo	C
<i>Athsp70-4</i>	BAB02269	Citoplasma/Núcleo	C, I*
<i>Athsp70-5</i>	AAF18501	Citoplasma/Núcleo	C, I*
<i>Athsp70-6</i>	CAB45063	Cloroplasto	C*, I
<i>Athsp70-7</i>	BAA97012	Cloroplasto	C*, I
<i>Athsp70-8</i>	AAD15393	Cloroplasto	C, I*
<i>Athsp70-9</i>	CAB37531	Mitocondria	C, I
<i>Athsp70-10</i>	CAB89371	Mitocondria	C, I
<i>Athsp70-11</i>	AAF88019	Retículo endoplasmático	C
<i>Athsp70-12</i>	BAB08435	Retículo endoplasmático	C
<i>Athsp70-13</i>	AAB70400	Retículo endoplasmático	C
<i>Athsp70-14</i>	AAG52240	Citoplasma/Núcleo	C, I
<i>Athsp70-15</i>	AAG52244	Citoplasma/Núcleo	C, I
<i>Athsp70-16</i>	AAD30257	Citoplasma	C, I
<i>Athsp70-17</i>	Z97341	Retículo endoplasmático	C*, I
<i>Athsp70-18</i>	AAG51503	Citoplasma/Núcleo	In

C, constitutiva; I, inducible; C*, constitutiva y relativamente abundante; I*, altamente inducible; In, indetectable.

Los resultados del blastn local en el genoma de *C. papaya* cv SunUp, a partir de los 18 miembros de HSP70 descritos para *Arabidopsis* arrojaron 10 posibles genes que codifican para esta proteína en papaya (tabla 2.4). Las secuencias, nombradas como *Cphsp70-1* al *10* presentaron

porcentajes de identidad entre 79% (*Cphsp70-9*) y 83% (*Cphsp70-3*) y valores esperados (E) entre $3E^{-80}$ y 0.

Tabla 2.11. Secuencias *hsp70* de *C. papaya* obtenidas a partir de sus genes ortólogos de *A. thaliana*.

Nombre	Gen	Score	Valor (E)	% Identidad
<i>Cphsp70-1</i>	evm.model.supercontig_1.398 pacid=16404341	466	0	82
<i>Cphsp70-2</i>	evm.model.supercontig_113.35 pacid=16406045	380	0	80
<i>Cphsp70-3</i>	evm.model.supercontig_15.10 pacid=16409311	560	0	83
<i>Cphsp70-4</i>	evm.model.supercontig_152.1 pacid=16409591	155	2E-82	81
<i>Cphsp70-5</i>	evm.model.supercontig_20.39 pacid=16413063	395	0	81
<i>Cphsp70-6</i>	evm.model.supercontig_260.3 pacid=16415348	459	0	81
<i>Cphsp70-7</i>	evm.model.supercontig_46.176 pacid=16420462	85	8E-41	82
<i>Cphsp70-8</i>	evm.model.supercontig_602.2 pacid=16423801	151	3E-80	80
<i>Cphsp70-9</i>	evm.model.supercontig_68.26 pacid=16424823	199	1E-109	79
<i>Cphsp70-10</i>	evm.model.supercontig_755.2 pacid=16425960	262	1E-146	80

Por otro lado, existen 7 genes que codifican para HSP90 en *A. thaliana* descritos por Krishna et al., (2001) que, al igual que el resto de las familias Heat Shock pueden localizarse dentro de diferentes compartimientos subcelulares y pueden o no ser inducibles por alta temperatura, a excepción de *Athsp90-4* y 7 de las cuales no existen reportes (tabla 2.5).

Tabla 2.12. Secuencias correspondientes a *hsp90* de *A. thaliana* según su número de accesión obtenidas de la base de datos NCBI.

Gen	Número de accesión	Localización	Expresión
<i>Athsp90-1</i>	BAA98082	Citoplasma/núcleo	I
<i>Athsp90-2</i>	BAB09285	Citoplasma/núcleo	M
<i>Athsp90-3</i>	BAB09283	Citoplasma/núcleo	M
<i>Athsp90-4</i>	BAB09282	Citoplasma/núcleo	
<i>Athsp90-5</i>	AAD32922	Cloroplasto	B
<i>Athsp90-6</i>	AAF13098	Mitocondria	B
<i>Athsp90-7</i>	CAB45054	Retículo endoplasmático	

I, inducible; M, moderadamente inducible; B, baja inducción.

Al realizar el blastn local a partir de las secuencias *hsp90* de *Arabidopsis* se encontraron 5 posibles genes que codifican para HSP90 en *C. papaya* con porcentajes de identidad entre 80% (*Cphsp90-3* y 4) y 83% (*Cphsp90-2*) y valor esperado (E) entre $5E^{-58}$ y 0 (tabla 2.6).

Tabla 2.13. Secuencias *hsp90* de *C. papaya* obtenidas a partir de sus genes ortólogos de *A. thaliana*

Nombre	Gen	Score	Valor (E)	% Identidad
<i>Cphsp90-1</i>	evm.model.supercontig_107.112 pacid=16405294	334	0	81
<i>Cphsp90-2</i>	evm.model.supercontig_12.106 pacid=16406644	675	0	83
<i>Cphsp90-3</i>	evm.model.supercontig_136.24 pacid=16408313	114	5E-58	80
<i>Cphsp90-4</i>	evm.model.supercontig_29.53 pacid=16416262	260	1E-145	80
<i>Cphsp90-5</i>	evm.model.supercontig_998.4 pacid=16429332	234	1E-129	83

A partir de las secuencias Heat Shock Protein de *Arabidopsis*, se obtuvieron 5, 10 y 5 posibles genes que codifican para HSP17.8, HSP70, HSP90 respectivamente en *C. papaya*. La reducción de secuencias en el genoma de papaya en diferentes familias de factores de transcripción en comparación con *A.thaliana* ha sido reportada previamente dentro del grupo de investigación (Bautista, 2020; Girón, 2015; Alcocer, 2013; Idrovo, 2012). Los autores hacen referencia que la reducción en el número de genes se debe a características clave dentro de la evolución de *C. papaya*.

2.3.2 Alineamiento y análisis de dominios de secuencias proteicas HSP17.8, HSP70 y HSP90 encontradas en *C.papaya*

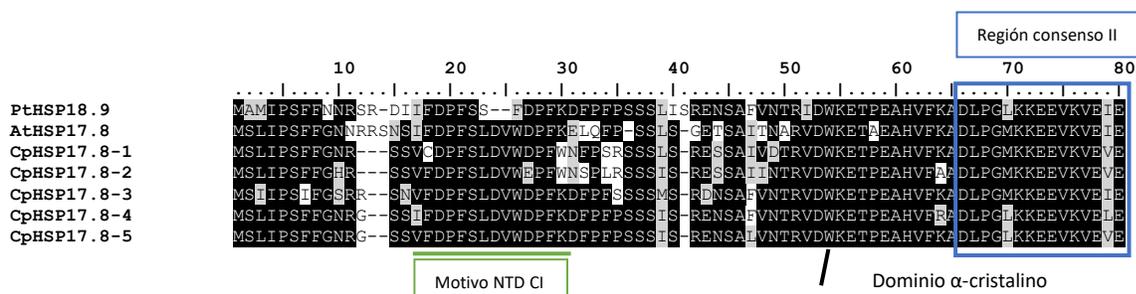
Un total de 5 miembros HSP17.8 se encontraron en el genoma de *C. papaya* cv SunUp con marcos de lectura abiertos entre 462 y 465 pares de bases (tabla 2.7). Después de realizar su traducción a proteína se obtuvo pesos moleculares entre 17.55 kDa (*Cphsp17.8-5*) y 17.68 kDa (*Cphsp17.8-3*) con puntos isoeléctricos de 5.98 y 5.97 respectivamente. La localización predicha según el software WoLF PSORT indicó que todas proteínas se localizaban en el citoplasma al igual que las proteínas HSP17.8 de *Arabidopsis* y *Populus*.

Tabla 2.14. Miembros *hsp17.8* identificados en *C. papaya*. Se indica el nombre del gen, el ORF, número de aa, peso molecular y la localización predicha de las proteínas.

Nombre	ORF	Aa	Pm (kDa)	pl	Localización predicha
<i>Cphsp17.8-1</i>	462	153	17.58	5.74	Citoplasmática
<i>Cphsp17.8-2</i>	462	153	17.61	6.14	Citoplasmática
<i>Cphsp17.8-3</i>	465	154	17.68	5.97	Citoplasmática
<i>Cphsp17.8-4</i>	465	154	17.61	5.98	Citoplasmática
<i>Cphsp17.8-5</i>	465	154	17.55	5.98	Citoplasmática

ORF, open reading frame (marco de lectura abierto); aa, aminoácidos; Pm, peso molecular (kDa); pl, punto isoeléctrico.

El múltiple alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de cada CpHSP17.8 con AtHSP17.8 y PtHSP17.8 mostró el dominio α -cristalino característico de small heat shock proteins, localizado cerca de la región C-terminal, el cual contiene dos dominios conservados o regiones consenso I y II. Así mismo, se identificó el motivo conservado que pertenece a la clase citosólica I dentro de la familia sHSP, confirmando la localización subcelular predicha (Figura 2.1).



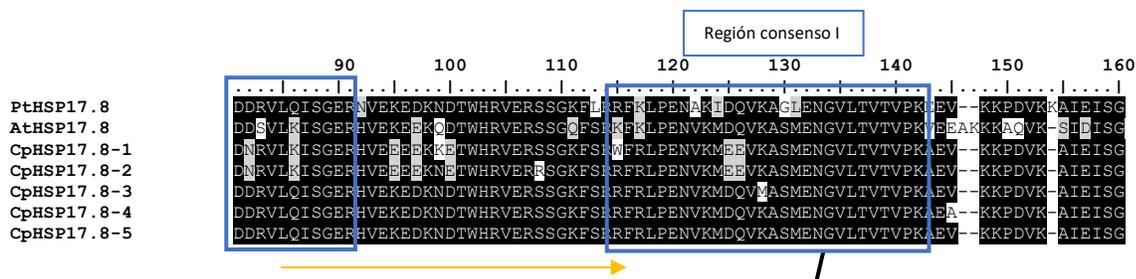


Figura 2.3. Alineamiento de secuencias HSP17.8 de *A. thaliana* (At), *Populus trichocarpa* (Pt) y *C. papaya* (Cp). Las sombras en negro y gris indican conservación en los residuos al 100% y 75% respectivamente, mientras que el fondo blanco corresponde a residuos divergentes. Las cajas azules señalan las regiones consenso dentro del dominio α -cristalino, mientras que la línea verde corresponde al motivo N-terminal de la subclase, citosol I. “ / “ abarca los dominios en el alineamiento señalados con flechas amarillas.

De igual manera se analizó los motivos conservados de CpHSP17.8, AtHSP17.8 y PtHSP17.8. Los resultados indicaron que CpHSP17.8 y AtHSP17.8 contenían 5 motivos conservados con 8 y 50 aminoácidos, mientras que PtHSP17.8 presentó 4 motivos (Figura 2.2). Entre ellos, el motivo 3 y 4 contenía en menor número de aminoácidos (8). Por otro lado, el motivo 1 contenía 50 aminoácidos. A excepción del motivo 5, en *Populus*, todos los demás miembros presentaron los motivos restantes.

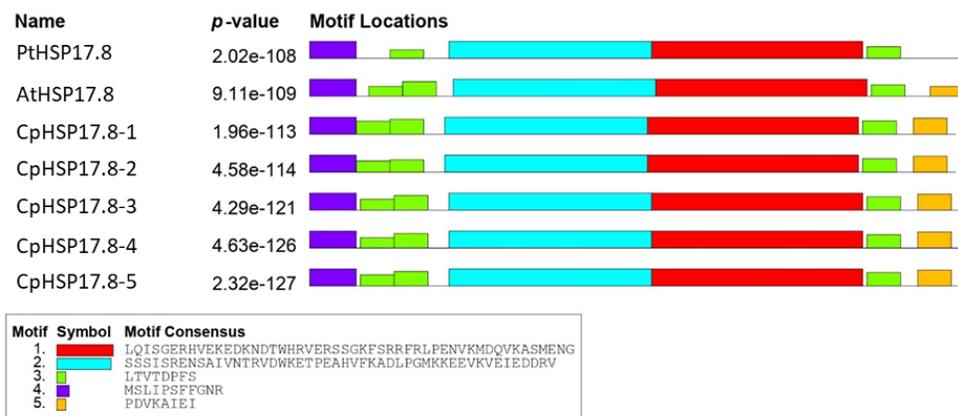


Figura 2.4. Motivos conservados y su valor p de HSP17.8 de *C. papaya*, *A. thaliana* y *P. trichocarpa*.

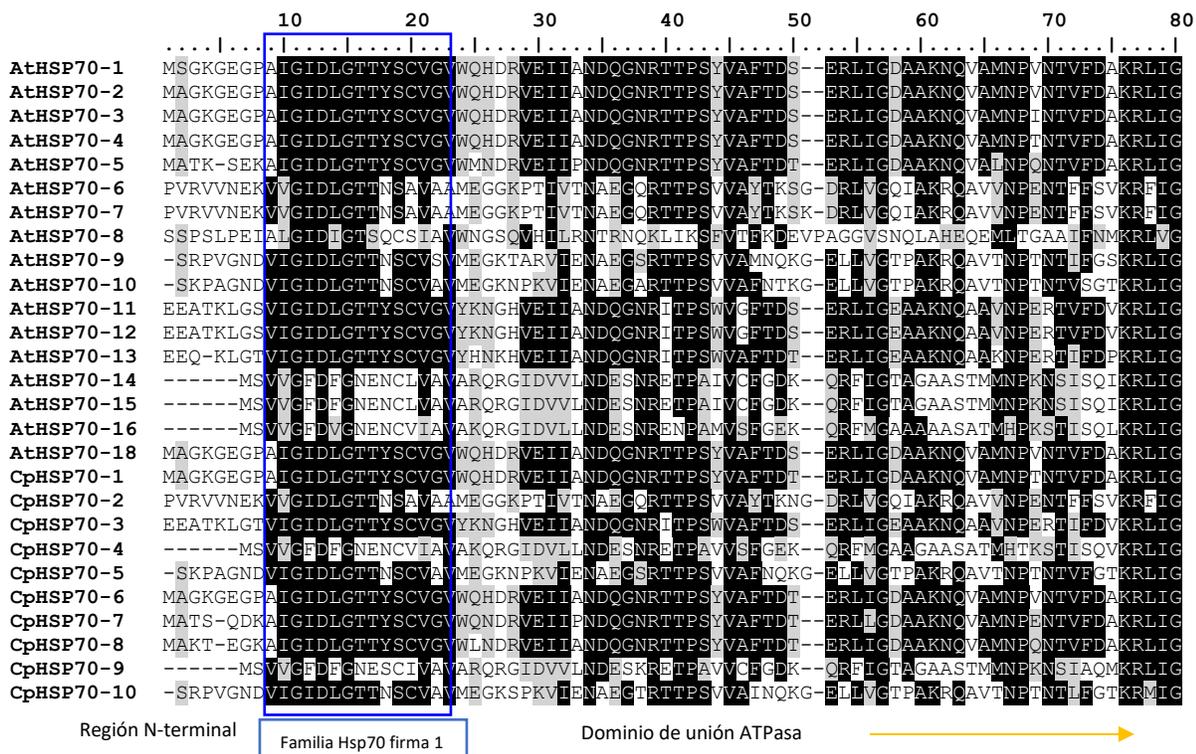
Se identificó 10 miembros pertenecientes a HSP70 en *C. papaya* con marcos de lectura abiertos entre 1947 (*Cphsp70-1*) y 2514 (*Cphsp70-9*) pares de bases traducidos a 648 y 837 aminoácidos respectivamente. De igual manera, los pesos moleculares predichos para estas proteínas estuvieron entre 92.4 kDa con punto isoeléctrico igual a 5.33 ubicada en el citoplasma y 70.96 kDa con punto isoeléctrico de 5.13 con la misma localización (tabla 2.8).

Tabla 2.8. Miembros HSP70 identificados en *C. papaya*. Se indica el nombre del gen, el ORF, número de aa, peso molecular y la localización predicha de las proteínas.

Nombre	ORF	Aa	Mw (KDa)	pl	Localización predicha
<i>Cphsp70-1</i>	1947	648	70.96	5.13	Citoplasmática
<i>Cphsp70-2</i>	2139	712	76.24	5.36	Cloroplasto
<i>Cphsp70-3</i>	1998	665	73.27	5.13	ER
<i>Cphsp70-4</i>	2394	797	89.01	5.99	Citoplasma/Núcleo
<i>Cphsp70-5</i>	2043	680	73.09	5.59	Mitocondria/Cloroplasto
<i>Cphsp70-6</i>	1965	654	71.46	5.13	Citoplasmática
<i>Cphsp70-7</i>	1956	651	71.59	5.19	Citoplasmática
<i>Cphsp70-8</i>	1968	655	71.6	5.3	Citoplasmática
<i>Cphsp70-9</i>	2514	837	92.4	5.33	Citoplasmática
<i>Cphsp70-10</i>	2046	681	73.26	6.03	Mitocondria

ORF, open reading frame (marco de lectura abierto); aa, aminoácidos; Pm, peso molecular (kDa); pl, punto isoeléctrico; ER, retículo endoplasmático.

El alineamiento de secuencias proteicas entre los miembros HSP70 de *Carica* y *Arabidopsis* mostró que los 3 dominios funcionales (dominio de unión ATPasa, dominio de unión al sustrato y dominio C-terminal) estaban presentes en todas las proteínas. Igualmente, las 3 firmas características de la familia HSP70 dentro del dominio de unión ATPasa se identificó en todas las CpHSP70. Por otro lado, la firma mitocondrial se identificó en las secuencias CpHSP70-5 y CpHSP70-10. Adicionalmente, la señal citosólica se identificó en las secuencias CpHSP70-1,6,7 y 8, mientras que solo la secuencia CpHSP70-2 presentó la señal característica del cloroplasto (Figura 2.3). Todas las señales correspondieron con lo encontrado en su localización predicha.



	90	100	110	120	130	140	150	160
AtHSP70-1	RRFSDSSVQSDMKLWPFKIQAGPADKPMIVVEYK	GEEKEFAAEEISSMVLTKMREIAEAALGVTIKNAVVTVPAYFNDS						
AtHSP70-2	RRFSDASVQSDRQLWPFITISGTAEKPMIVVEYK	GEEKQFAAEEISSMVLTKMREIAEAALGTTIKNAVVTVPAYFNDS						
AtHSP70-3	RRFTDSSVQSDIKLWPFITLKSQPAEKPMIVVNYK	GEDKEFSAAEEISSMVLTKMREIAEAALGTTIKNAVVTVPAYFNDS						
AtHSP70-4	RRYSDPSVQADKSHWPFKVVSGPGEKPMIVVNHK	GEEKQFSAAEEISSMVLTKMREIAEAALGSPVKNNAVVTVPAYFNDS						
AtHSP70-5	RKFSDFPSVQSDILHWPFKVVSGPGEKPMIVVSYK	NEEKQFSPEEISSMVLTKMREIAEAALGRTVKNNAVVTVPAYFNDS						
AtHSP70-6	RKMN--EVDEESKQVSYRVVRDENNVKLECPAI	---NKQFAAEEISSAQVLRKLVDDASRELNDKVTKAVITVPAYFNDS						
AtHSP70-7	RRMN--EVAEESKQVSYRVIKDENGNVKLDCPAI	---GKQFAAEEISSAQVLRKLVDDASRELNDKVTKAVITVPAYFNDS						
AtHSP70-8	RVDTDPPVHASKNLPFLVQTLDIGVREFFIAALVN	NAWRSTTPEEVLAIFFVELRLMAEAQLKRPVVRNVITVPVPSFSRF						
AtHSP70-9	RRFDDPQTKEMKMVPEYKIVRAPNGDAWVEAN	----GQKFSPSQIGANVLTMMKETAEAALGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						
AtHSP70-10	RRFDDPQTKEMKMVPEYKIVRAPNGDAWVEAN	----GQYSPSQIGAFVLTMMKETAEAALGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						
AtHSP70-11	RKFEDEKQVQDRKLVPEYQIVNKDG-KPYIQVKIKD	GETKVFSPPEEISAMVLTMMKETAEAALGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						
AtHSP70-12	RKFEDEKQVQDRKLVPEYQIVNKDG-KPYIQVKIKD	GETKVFSPPEEISAMVLTMMKETAEAALGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						
AtHSP70-13	RKFEDEKQVQDRKLVPEYQIVNKDG-KPYIQVKIKD	GETKVFSPPEEISAMVLTMMKETAEAALGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						
AtHSP70-14	RQFSDPELQDRIKSLPFSVTEGPDGYPLIHANYL	GEKRAFPTPTQVMGMMLSNLKGTAACKNLNTAVVDCGIGIPVYFTDL						
AtHSP70-15	RQFSDPELQDRIKSLPFSVTEGPDGYPLIHANYL	GEKRAFPTPTQVMGMMLSNLKGTAACKNLNTAVVDCGIGIPVYFTDL						
AtHSP70-16	RKFRPEVDQNDLRLFPFETSESDGGIQRIRLYM	GEIQSFSFVQILGMLLSHLKQTAEKSLKTPVSDCVIGIPSYFTNS						
AtHSP70-18	RRFSDASVQSDMKLWPFKVIIFGPGDKPMIVVNYK	GEEKQFAAEEISSMVLTKMREIAEAALGSSIKNAVVTVPAYFNDS						
CpHSP70-1	RRFSDASVQSDIKLWPFKVIIFGPGDKPMIVVNYK	GEEKQFAAEEISSMVLTKMREIAEAALGSTVKNNAVVTVPAYFNDS						
CpHSP70-2	RKMS--EVDEESKQVSYRVVRDENNVKLDCPAI	---GKQFAAEEISSAQVLRKLVDDASKELNDKVTNAVVTVPAYFNDS						
CpHSP70-3	RKFEDEKQVQDRKLVPEYKIVNKDG-KPYIQVKIKD	GETKVFSPPEEISAMVLTMMKETAEAALGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						
CpHSP70-4	WKFKPEVDQHEHLKLFPEFETCEGPDGGIQRIFQYM	GETHREFSVQILAMLSHLLKQITTEKNLKTSSDCVIGIPSYFTDL						
CpHSP70-5	RRFDDPQTKEMKMVPEYKIVRAPNGDAWVEAN	----GQYSPSQIGAFVLTMMKETAEAALGKAVTKAVITVPAYFNDA						
CpHSP70-6	RRFSDASVQSDIKLWPFKVIIFGPGDKPMIVVNYK	GEDKQFAAEEISSMVLTKMREIAEAALGSTVKNNAVVTVPAYFNDS						
CpHSP70-7	RRFSDSSVQSDMKLWPFKVIIFGPGDKPTIVVKYK	GEEKQFSAAEEISSMVLTKMREIAEAALGYTVNNNAVVTVPAYFNDS						
CpHSP70-8	RRFSDPSVQSDMKLWPFKVVAGPGEKPMIVVQHK	GEEKQFSAAEEISSMVLTKMREIAEAALGQNVKNNAVVTVPAYFNDS						
CpHSP70-9	RQFSDPELQDRIKSLPFAVTEGPDGYPLIHAR	-----SGMVLNLSIAACKNLNAAVVDCGIGIPVYFTDL						
CpHSP70-10	RRFDDPQTKEMKMVPEYKIVRAPNGDAWVEAN	----GQYSPSQIGAFVLTMMKETAESYLGKSTKNNAVVTVPAYFNDA						

Firma mitocondrial

	170	180	190	200	210	220	230	240
AtHSP70-1	QRQATKDAGVITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-2	QRQATKDAGVITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-3	QRQATKDAGVITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-4	QRQATKDAGVITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-5	QRQATKDAGVITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-6	QRTATKDAGRITAGLEVLRINEPTAASLAYG	-----FDRKANE---	TTLVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-7	QRTATKDAGRITAGLEVLRINEPTAASLAYG	-----FERKSNE---	TTLVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-8	QLTRFERACAMAGLHVLRLMPEPTAATALLYAQQQ	MTHTDNMGSSERLAVIFNMGAGYCDVAVTATAGVTSQIKALAG						
AtHSP70-9	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAALSISYG	-----MNNKEG---	LIAVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-10	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAALSISYG	-----MNNKEG---	LIAVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
AtHSP70-11	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKG---	GEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD				
AtHSP70-12	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKG---	GEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD				
AtHSP70-13	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKG---	GESNII	LVYDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD				
AtHSP70-14	QRRAVLDAATITAGLHPLRLIHETTATALAYG	-----IYKTDLP-ESDQ	LNVAVIDIGHASMQVCIA	GFKKGQLKILSHAFD				
AtHSP70-15	QRRAVLDAATITAGLHPLRLIHETTATALAYG	-----IYKTDLP-ENDQ	LNVAVIDIGHASMQVCIA	GFKKGQLKILSHAFD				
AtHSP70-16	QRLAYLDAATITAGLHPLRLIHETTATALAYG	-----IYKTDLVANS	SPTYIVFIDIGHCDTQVCVA	BFESGSMRVRSHAFD				
AtHSP70-18	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
CpHSP70-1	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
CpHSP70-2	QRTATKDAGRITAGLEVLRINEPTAASLAYG	-----FEKKNNE---	TTLVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
CpHSP70-3	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKG---	GEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD				
CpHSP70-4	QRRAYLDAATITAGLHPLRLIHETTATALAYG	-----IYKTDLP-NV	GPTYVLFVDIGHCDTQVCIA	BFESGSMKIVSHASD				
CpHSP70-5	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAALSISYG	-----MNNKEG---	LIAVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
CpHSP70-6	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKAATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					
CpHSP70-7	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKASRTGEQ	ENLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD				
CpHSP70-8	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAAAIAYG	-----LDKKSRTGEQ	ENLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD				
CpHSP70-9	QRRAVLDAATITAGLHPLRLIHETTATALAYG	-----IYKTDLP-ENDQ	LNVAVIDIGHASMQVCIT	GFKKGQLKILSHAFD				
CpHSP70-10	QRQATKDAGRITAGLNVMRIINEPTAALSISYG	-----LNNKEG---	LIAVFDLGGGTFDVSLLTIEEGHFEVKATAGD					

Familia Hsp70 firma 2

```

                250      260      270      280      290      300      310      320
AtHSP70-1  THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKSKKDITGNPRALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLYEGID----FYSTITRAR
AtHSP70-2  THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKNKQDITGQPRALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLYGGAD----FYSPITRAR
AtHSP70-3  THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKNKKDISGNPRALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLFDGID----FYAPITRAR
AtHSP70-4  THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKNKKDITGNPRALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLFEGID----FYTTITRAR
AtHSP70-5  THLGGEDFDNRLVNHVFAEFRRKHKKDIAGNARALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLHEGID----FYATISRAR
AtHSP70-6  THLGGDFDKRVVDWLAAEFKKDEGIDLLKDKQALORLTEAAEKAKIELSSLTQTNMSLPFITATADGPKHIETTTTRAK
AtHSP70-7  THLGGDFDKRVVDWLASTFKKDEGIDLLKDKQALORLTEAAEKAKIELSSLTQTNMSLPFITATADGPKHIETTTTRGK
AtHSP70-8  SPIGGEDILQNTIRHAPPNEEASG-----LLRVAQDAIHRITDQENVQIEVDLGNNGKIS----KVLDRLE
AtHSP70-9  TELGGEDFDNLTLEYLVNEFKRSDNIDLTKDNLALORLREAAEKAKIELSSTQTEINLPFITADASGAKHLNITLTRSK
AtHSP70-10 TELGGEDFDNALLDLFLVNEFKRTEGIDLSKDRALORLREAAEKAKIELSSTQTEINLPFITADASGAKHFNITLTRSR
AtHSP70-11 THLGGEDFDHRVMEYFIKLIKQKHQKDISKDNKALGKLRRECERAKRALSSQHQVRVEIESLFDGVD----FSEPTTRAR
AtHSP70-12 THLGGEDFDHRIMEYFIKLIKQKHQKDISKDNKALGKLRRECERAKRALSSQHQVRVEIESLFDGVD----LSEPTTRAR
AtHSP70-13 THLGGEDFDHRVMDYFIKLVKQKYNKDISKDHKALGKLRRECELAKRSLNQHQVRVEIESLFDGVD----FYATISRAR
AtHSP70-14 RSLGGDFDFEVLFNHFAAKFKDEYKIDVSNAKASIRLRATCEKLRKVLNANPLAPLNIECLMDEKD----VRGVTKREE
AtHSP70-15 RSLGGDFDFEVLFNHFAAKFKDEYKIDVSNAKASIRLRATCEKLRKVLNANPLAPLNIECLMAEKD----VRGVTKREE
AtHSP70-16 RNLGGDFDFEVLFNHFALEFKKYNIDVYNTNKACVRLRASCEKLRKVLNANAEALNIECLMEEKD----VRSFTKREE
AtHSP70-18 THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKNKKDISGDARALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLFEGID----FYSTITRAK
CpHSP70-1  THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKNKKDISGNPRALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLYEGID----FYSTITRAR
CpHSP70-2  THLGGDFDKRIVDWLASNEKRDDEGIDLLKDKQALORLTETAEKAKMELSSLTQTNMSLPFITATADGPKHIETTTTRAK
CpHSP70-3  THLGGEDFDHRIMEYFIKLIKQKHGKDISKDNRALGKLRRECERAKRALSSQHQVRVEIESLFDGVD----FSEPTTRAR
CpHSP70-4  RSLGGDFDFEVLFNHFAATQFKEHYNDVYNTTKASIRLRASCEKLRKVLNANAEAPLNIECLMDEKD----VKSFTKREE
CpHSP70-5  THLGGEDFDNALLDLFLVNEFKRTEGIDLSKDRALORLREAAEKAKIELSSTQTEINLPFITADASGAKHLNITLTRSK
CpHSP70-6  THLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKNKKDISGNPRALRRLRTACERAKRTLSSTAQTTEIDSLYEGID----FYSTITRAR
CpHSP70-7  THLGGEDFDNRLVNHVFAEFRRKHKKDISGNSRALRRLRTACERAKRALSSSTQTEIDSLYEGID----FYAITRAR
CpHSP70-8  THLGGEDFDNRLVNHVFAEFRRKHKKDISGNARALRRLRTACERAKRTLSSTQTEIDSLYEGID----FYSTITRAR
CpHSP70-9  RSLGGDFDFEVLFNHFAAKFKDEYKIDVFNARACIRLRATCEKLRKVLNANPEAPLNIECLMDEKD----VRGVTKRDE
CpHSP70-10 TELGGEDFDNALLEFTVSEFKRTENIDLTKDRALORLREAAEKAKIELSSTQTEINLPFITADASGAKHLNITLTRSK

```

```

                330      340      350      360      370      380      390      400
AtHSP70-1  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
AtHSP70-2  FEEMNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKSTVHEIVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
AtHSP70-3  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKNSIDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
AtHSP70-4  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKSSVHDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
AtHSP70-5  FEEMNMDLFRKCMPEVEKVLKDAKLDKSSVHDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
AtHSP70-6  FEELCSDLLDRVRTPVENSLRDAKLSFKDIDDEVILVGGSTRIPAVQELVRKVT-GKEPNVTVPNDEVVALGAAVQAGVLA
AtHSP70-7  FEELCSDLLDRVRTPVENSLRDAKLSFKDIDDEVILVGGSTRIPAVQELVRKLT-GKEPNVSVNPNDEVVALGAAVQAGVLS
AtHSP70-8  FEEVNVKVFEECERLVVQCLRDARVNGGDDIDIMVGGCSYIPKVRTTIKVNCKKDEIYKGVNPLEAVRGAALGAVTS
AtHSP70-9  FEGIVGKLIERTRSPCKNCLRDAGVTIKEVDEVILVGGMTRVPKVQELVSEIF-GKSPCKGVNPNDEAVAMGAALQGGILR
AtHSP70-10 FETLVNHLIERTRDPCKNCLRDAGISAKEVDEVILVGGMTRVPKVQELVSEIF-GKSPKGVNPNDEAVAMGAALQGGILR
AtHSP70-11 FEELNMDLFRKTMGPVKKAMDAGLQKSIDDEVILVGGSTRIPKVQQLKDFDFEGKEPNKGVNPNDEAVAYGAAVQGGILS
AtHSP70-12 FEELNMDLFRKTMGPVKKAMDAGLQKSIDDEVILVGGSTRIPKVQQLKDFDFEGKEPNKGVNPNDEAVAYGAAVQGGILS
AtHSP70-13 FEELNMDLFRKTMGPVKKALRDAGLKKSDIDDEVILVGGSTRIPKVQQLKDFDFEGKEPNKGVNPNDEAVAYGAAVQGGVLS
AtHSP70-14 FEEISIPILERVKRPLEKALSDAGLTVEDVHMVEVIGSGSRVPAMIKILTEFF-GKEPRRTMNASECVSRGALQQAAIL
AtHSP70-15 FEEISIPILERVKRPLEKALSDAGLTVEDVHMVEVIGSGSRVPAMIKILTEFF-GKEPRRTMNASECVSRGALQQAAIL
AtHSP70-16 FEQLSAGLLERLIVPCQKALADSGLSLDQHSVELVGSGRIPAIKMLSSIF-KRELGRVTNASECVARGALQQAAIL
AtHSP70-18 FEEMNMDLFRKCMPEVVKCLRDSKMDKSMVHDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
CpHSP70-1  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
CpHSP70-2  FEELCSDLLDRCKTVENALRDAKLSFKDLEDEVILVGGSTRIPAVQELVKMT-GKEPNVTVPNDEVVALGAAVQAGVLA
CpHSP70-3  FEELNMDLFRKTMGPVKKAMDAGLQKSIDDEVILVGGSTRIPKVQQLRDFDFEGKEPNKGVNPNDEAVAYGAAVQGGILS
CpHSP70-4  FERLSSTLIERISVPCQKALVNSGLTVEKIHVELVGSGRVPATIRMLTSIF-KKEPSRTINASECVARGALQQAAIL
CpHSP70-5  FESLVNHLIERTKNPKCNCLRDAGISTKEVDEVILVGGMTRVPKVQELVMEIF-GKTPSKGVNPNDEAVAMGAALQGGILR
CpHSP70-6  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
CpHSP70-7  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKIDKSLVNEVILVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
CpHSP70-8  FEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDSKIDKSNVHEVVLVGGSTRIPKVQQLQDFDFNGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
CpHSP70-9  FEQISVPILEVRKRPLEKALSEAGLTLENVHMVEVIGSGSRVPATIRILTEFF-GKEPRRTMNASECVARGALQQAAIL
CpHSP70-10 FEGLVNHLIERTRNPKCNCLRDAGITVKELEDEVILVGGMTRVPKVQELVSEIF-GKSPKGVNPNDEAVAMGAALQGGILR

```

Familia Hsp70 firma 3

```

                410      420      430      440      450      460      470      480
AtHSP70-1  GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLETAG-----GVMTLIPRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQ
AtHSP70-2  GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLETAG-----GVMTLIQRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQ
AtHSP70-3  GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLETAG-----GVMTLIQRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQ

```

AtHSP70-4	GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLLETAG-----GVMTVLIPRNTTIPTKKEQIFSTYSDNQPGVLIQ
AtHSP70-5	GEGSEKVQ-----DLLLLDVAPLSLGLLETAG-----GVMTVLIPRNTTIPTKKEQVVFSTYADNQPGVLIQ
AtHSP70-6	GDVS-----DIVLLDVTPLSLGLLETG-----GVMTKIIPRNTTLPSTKSEVVFSTAADGQTSVEIN
AtHSP70-7	GDVS-----DIVLLDVTPLSLGLLETG-----GVMTKIIPRNTTLPSTKSEVVFSTAADGQTSVEIN
AtHSP70-8	GIHDPFGS-----DILLTQATPLAVGVRANG-----NKFIPIPRNTMVPARKDLFFTTVDNQKEALII
AtHSP70-9	GDVK-----DLLLLDVVPLSLGLLETG-----AVFTKLIIPRNTTIPTKKSOVFSTAADNQMGVGIK
AtHSP70-10	GDVK-----ELLLLDVTPLSLGLLETG-----GVFTRLIIRNTTIPTKKSOVFSTAADNQTVGIR
AtHSP70-11	GEGGDETK-----DILLLDVAPLTLGLLETVG-----GVMTKLIIPRNTVIPTKKSQVFTTYQDQOTVWSIQ
AtHSP70-12	GEGGDETK-----DILLLDVAPLTLGLLETVG-----GVMTKLIIPRNTVIPTKKSQVFTTYQDQOTVWSIQ
AtHSP70-13	GEGGEETQKNLTLTKTDILLLDVAPLSLGLLETVG-----GVMTNIIPRNTVIPTKKSQVFTTYQDQOTVVTIN
AtHSP70-14	PTFKVR-----EFQVHESFPFSISLAWKGAASEAQNGGAENQOSTIVFPKGNPIPSVK--ALTFYRSGETFSVDVQ
AtHSP70-15	PTFKVR-----EFQVHESFPFSISLAWKGAATDAQNGGTENQOSTIVFPKGNPIPSVK--ALTFYRSGETFSIDVQ
AtHSP70-16	PVFRVR-----DYEVQDSYPAIFGSSD-----KGPINTSPNELLPKQGFPSVK--VLTLHRENTFQLEAF
AtHSP70-18	GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLLETG-----GVMTVLIPRNTTIPAKKEQEFHTTVDNQPDVLIQ
CpHSP70-1	GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLLETAG-----GVMTVLIPRNTTIPTKKEQVVFSTYSDNQPGVLIQ
CpHSP70-2	GDVS-----DIVLLDVTPLSLGLLETG-----GVMTKIIPRNTTLPSTKSEVVFSTAADGQTSVEIN
CpHSP70-3	GEGGDETK-----DILLLDVAPLTLGLLETVG-----GVMTKLIIPRNTVIPTKKSQVFTTYQDQOSTVWSIQ
CpHSP70-4	PVFRVR-----DYEVQDTFFPSIFGSLD-----KGPVCTSSSRMIFQKQVFPFSVK--IITLHRDSTIYLEAF
CpHSP70-5	GDVK-----ELLLLDVTPLSLGLLETG-----GIFTRLINRNTTIPTKKSOVFSTAADNQTVGVIK
CpHSP70-6	GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLLETAG-----GVMTVLIPRNTTIPTKKEQVVFSTYSDNQPGVLIQ
CpHSP70-7	GEGDEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLLETAG-----GVMTVLIPRNTTIPTKKEQIFSTYSDNQSGVLIQ
CpHSP70-8	GEGNEKVQ-----DLLLLDVTPLSLGLLETAG-----GVMTVLIPRNTTIPTKKEQIFSTYSDNQPGVLIQ
CpHSP70-9	PTFKVR-----EFQVHDLIFPFSIALSWKGSATDAQNGAVENQOSTIVFPKGNPLPSIK--ALTFYRSGETFSVDVQ
CpHSP70-10	GDVK-----ELLLLDVTPLSLGLLETG-----GIFTRLINRNTTIPTKKSAFSTAADNQTVGVIK

Domínio de unión al sustrato



	490	500	510	520	530	540	550	560
AtHSP70-1	VYEGERARTKDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQITVCFDIDANGILNVAEDKTTGQKNKIIITINDK-----							
AtHSP70-2	VYEGERARTKDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQITVCFDIDANGILNVAEDKTTGQKNKIIITINDK-----							
AtHSP70-3	VYEGERARTKDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQITVCFDIDANGILNVAEDKTTGQKNKIIITINDK-----							
AtHSP70-4	VYEGERARTKDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQITVCFDIDANGILNVAEDKTTGQKNKIIITINDK-----							
AtHSP70-5	VYEGERARTKDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQINVCFDIDANGILNVAEDKTAGVKNKIIITINDK-----							
AtHSP70-6	VLQGEREFVRDNKSLGSRFDLGGIPPAPR-----GVPQIEVKFDIDANGILSVSAVDKGTGKQKODITITGA-----							
AtHSP70-7	VLQGEREFVRDNKSLGSRFDLGGIPPAPR-----GVPQIEVKFDIDANGILSVSASDKGTGKQKODITITGA-----							
AtHSP70-8	IYEGEGETVEENHLLGYFKLVGIPPAPK-----GVPEINVCMDIDASNARVFAAVLMPGS-----							
AtHSP70-9	VLQGEREMADNKVLCGFDFLVGIPPAPR-----GMPQIEVTFDIDANGITVSAKDKATGKEQNIITRSS-----							
AtHSP70-10	VLQGEREMADNKVLCGFDFLVGIPPAPR-----GMPQIEVTFDIDANGITVSAKDKATGKQKQIITRSS-----							
AtHSP70-11	VYEGERSLTKDCRLLCKFDLNGIPPAPR-----GTPQIEVTFEVDANGILNVKAEDKASGKSEKIITITNEK-----							
AtHSP70-12	VYEGERSLTKDCRLLCKFDLNGIPPAPR-----GTPQIEVTFEVDANGILNVKAEDKASGKSEKIITITNEK-----							
AtHSP70-13	VYEGERSMTKDNRELCKFDLNGILPAPRNQYFRGVPQIEVTFEVDANGILQVKAEDKVAKTSQSIITINDK-----							
AtHSP70-14	YSDVNDLQ--APPKISTYTIIGPFQSSKG-----ERAKLKVVRNLNLHGIVSVESATLLEEEVEVSVTKEHSEETTKMDS-----							
AtHSP70-15	YSDVNDLQ--APPKISTYTIIGPFQSSKG-----ERAKLKVVRNLNLHGIVSVESATLLEEEVEVSVTKDQSEETAKMDT-----							
AtHSP70-16	YANHNELSPDIPTQISSFMIGPFHISHG-----EAARVKVRVQLNLHGIVTIDSATLIEYHKNITSEEMISEENHQSSA-----							
AtHSP70-18	VYEGERARTIDNNILGCFVLSGIPPAPR-----GIPQIEVTFDIDANGILNVAEDKATGKKNKIIITINDK-----							
CpHSP70-1	VYEGERTRTRDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQITVCFDIDANGILNVAEDKTTGQKNKIIITINDK-----							
CpHSP70-2	VLQGEREFVRDNKSLGSRFDLGGIPPAPR-----GVPQIEVKFDIDANGILSVTALDKGTGKQKODITITGA-----							
CpHSP70-3	VYEGERSLTKDCRLLCKFDLNGIPPAPR-----GTPQIEVTFEVDANGILNVKAEDKGTGKSEKIITITNEK-----							
CpHSP70-4	YTNNNELPSGVSPQISSFMIGPFQTSR-----ETARVKVRVQLNLHGIVTIDAAYLIEDHMDNSTSKEVEVSSQHMPSV-----							
CpHSP70-5	VLQGEREMADNKVLCGFELVGGIPPAPR-----GMPQIEVTFDIDANGITVSAKDKSTGKEQIITRSS-----							
CpHSP70-6	VYEGERTRTRDNLLCKFELSGIPPAPR-----GVPQITVCFDIDANGILNVAEDKTTGQKNKIIITINDK-----							
CpHSP70-7	VYEGERTRTRDNLLCKFELVGGIPPAPR-----GVPQINVCFDIDANGILNVAEDKTAGVKNKIIITINDK-----							
CpHSP70-8	VYEGERARTKDNLLCKFELVGGIPPAPR-----GVPQINVCFDIDANGILNVAEDKTAGVKNKIIITINDK-----							
CpHSP70-9	YSDVTELQ--LPAKISTYTIIGPFQSTKG-----ERAKLKVARLSLHGIVVAESATLLEED--VEVSVTKEHPEASKMDT-----							
CpHSP70-10	VLQGEREMASDNKLLGCFELVGGIPPAPR-----GMPQIEVTFDIDANGITVSAKDKATGKEQIITRSS-----							

	570	580	590	600	610	620	630	640
AtHSP70-1	-----							
AtHSP70-2	-----							
AtHSP70-3	-----							
AtHSP70-4	-----							
AtHSP70-5	-----							
AtHSP70-6	-----							
AtHSP70-7	-----							
AtHSP70-8	-----							
AtHSP70-9	-----							
AtHSP70-10	-----							


```

AtHSP70-18 KKFEEDSIEEVIQWLDDNQLAEAEDEFEHKMKELLESVWSTIITKMYQG-----
CpHSP70-1  KKIEDAIDSATQWLDCNQLAEAEDEFEDKMKELLESVCNPIIAKMYQG-AGADMG-----GGMEEDAPPAGGS-----
CpHSP70-2  EKVEAKLQELKDTIAGG---SIQAIKDAMTALNQEVMQLGQSLYNQPGAPGAPGAPGAPGGE-ASSD--SSSKGPD--G
CpHSP70-3  EKIEATAVKEALEWLDNQNAAEKEDYDEKLEVEAVCNPIITAVYQRSGGAPG--GG-----AADEDESHDEL-----
CpHSP70-4  EGITRNLQQTTEEWLYEDGDDESEHVYSQKLDLQKLVDPETRYKEGEARAQATRDLNHIIVDYRMAAGSLFP-----
CpHSP70-5  KEIEDAVADVVRKAMAGE---NVDEIKSKIDAANKAVSKI GQHMAGGSS--GGPTAGGS-----PGG---D
CpHSP70-6  KKIEDAIEQATQWLDSNQLAEAEDEFEDKMKELLESICNPIIAKMYQG-AGADMG-----AGMDDAPGAGSGAGAG
CpHSP70-7  QKIEKAAEETIEWLDRNQLAEVEELEDKLEEGVCNPIIAKMYQSGT--DVPPMGG-----YDMPPGGGGGSSNTG----
CpHSP70-8  QKIEKAIDETVEWLDNQLAEVEELEDKLELEGINCPIIAKMYQGGAGGDVPTGGD----PGMAGGYKASSGGS---
CpHSP70-9  EGFIAKLQEVEDWLYEDGEDETKGVYIAKLEELKKQGDPEERYKEHTEKRGSVIDQLVYCINSYREAAMSNDPKFDHIDL
CpHSP70-10 TETESAVADLRKALITGE---NINDIKAKLDAANKAVSKI GEHMSKGS SDSGSSSAGS-----QGG---E

```

```

                810
                ....|...|.
AtHSP70-1      -GAGPKIEEVD
AtHSP70-2      -GAGPKIEEVD
AtHSP70-3      -GAGPKIEEVD
AtHSP70-4      -GAGPKIEEVD
AtHSP70-5      -AGGPKIEEVD
AtHSP70-6      DVIDADFTDSQ
AtHSP70-7      DVIDADFTDSN
AtHSP70-8      -----
AtHSP70-9      QTPEAEFEEDAS
AtHSP70-10     QAPEAEYEEVK
AtHSP70-11     -----
AtHSP70-12     -----
AtHSP70-13     -----
AtHSP70-14     AEKQKVLNECV
AtHSP70-15     -RRWVTLKCV
AtHSP70-16     PRKNAVLDECH
AtHSP70-18     -----
CpHSP70-1      -GAGPKIEEVD
CpHSP70-2      DVIDADFTDSK
CpHSP70-3      -----
CpHSP70-4      VKKDAVIDECN
CpHSP70-5      QAPEAEYEEVK
CpHSP70-6      AGAGPKIEEVD
CpHSP70-7      -GAGPKIEEVD
CpHSP70-8      AGAGPTIEEVD
CpHSP70-9      SEKQKVLNECV
CpHSP70-10     QTPEAEYEEAR

```

Señal citosólica

Señal cloroplasto

Figura 2.3. Alineamiento de secuencias HSP70 de *C. papaya* (Cp), *A. thaliana* (At). Las sombras en negro y gris indican conservación en los residuos al 100% y 75% respectivamente, mientras que el fondo blanco corresponde a residuos divergentes. “ / ” abarca los dominios en el alineamiento señalados con flechas amarillas. Las cajas azules indican las 3 firmas conservadas para las proteínas HSP70. Por otro lado, las cajas naranja, morada y verde corresponden a los motivos correspondientes a la mitocondria, citosol y cloroplasto respectivamente.

Se encontró 20 motivos conservados en las proteínas CpHSP70 utilizando la herramienta de búsqueda de motivos MEME (figura 2.4). Los motivos 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 estuvieron presentes en todas las proteínas HSP70 a excepción de AtHSP70-8 que presentó el menor número de motivos (6). Según la localización subcelular predicha y el análisis de motivos, las proteínas citoplasmáticas poseían los mismos motivos conservados: 1-14, 19 y 20, pero carecían del motivo 17 comparadas con las proteínas citoplasmáticas AtHSP70-2, CpHSP70-7 y CpHSP70-8. De la misma manera, las proteínas con subclasificación cloroplástica: AtHSP70-6, 7 (con excepción de AtHSP70-8 y CpHSP70-2 comparten los mismos motivos conservados, patrón que se repite para las proteínas con subclasificación mitocondrial: AtHSP70-9, 10 y CpHSP70-5 y 10.

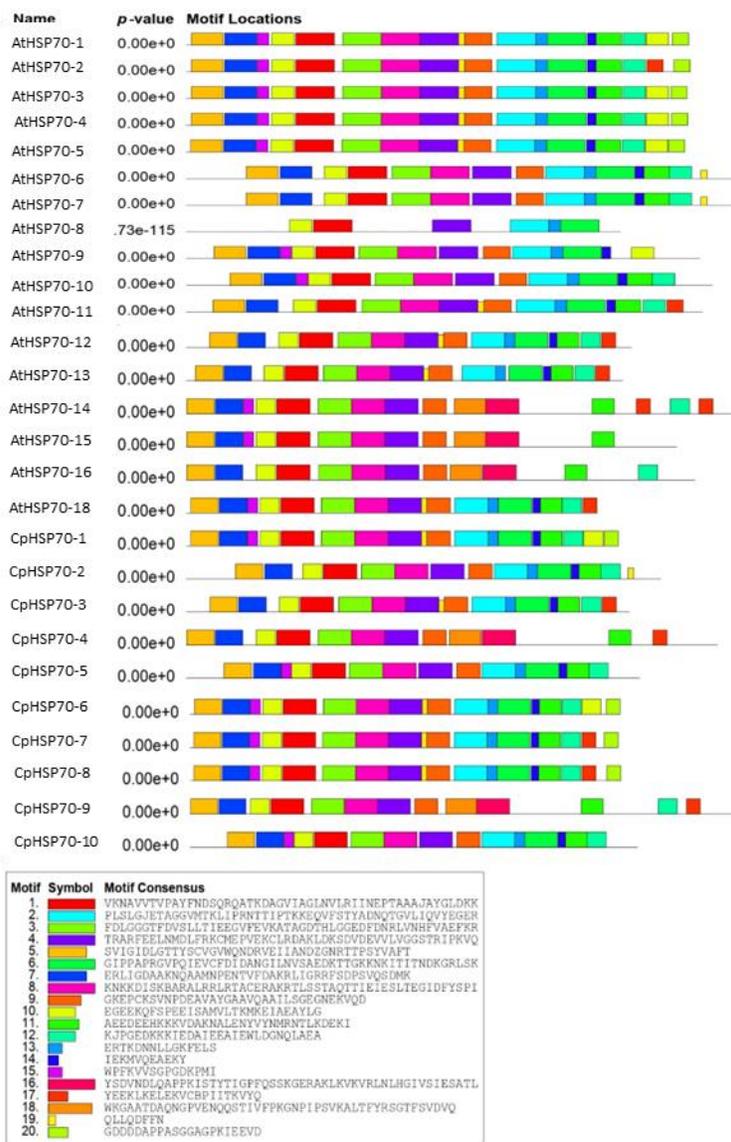


Figura 2.4. Motivos conservados y valor p de HSP70 de *C. papaya* y *A. thaliana*

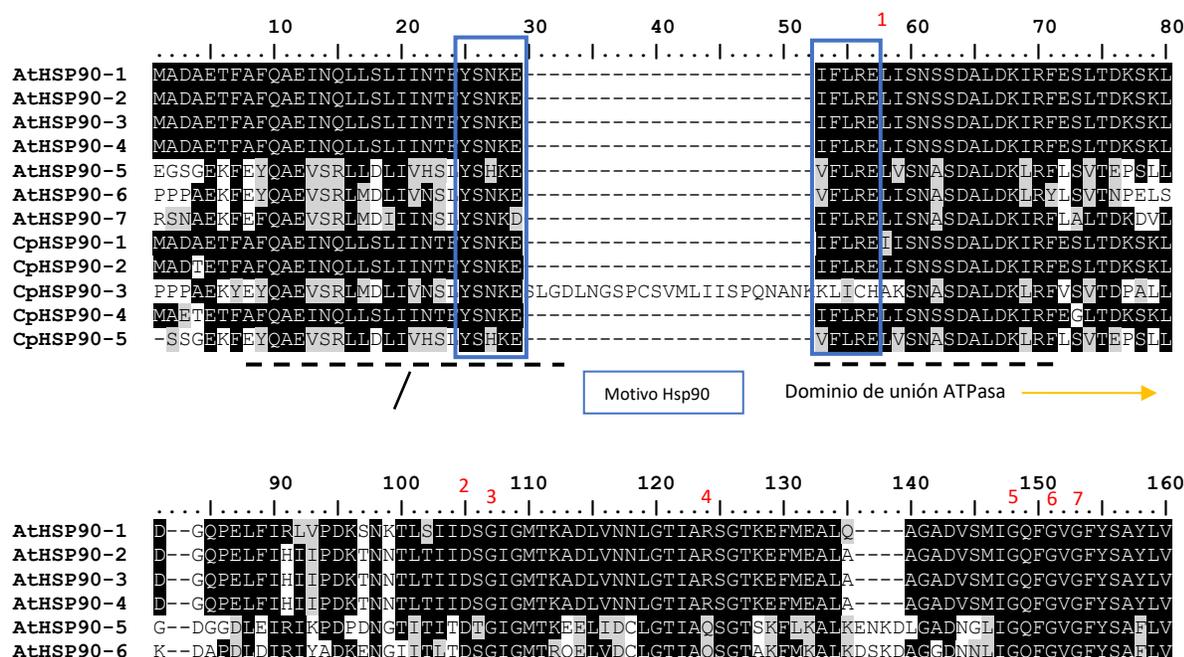
A partir de 7 genes ortólogos *hsp90* de *Arabidopsis* se obtuvo 5 genes *Cphsp90* con marcos de lectura entre 2100 (*Cphsp90-2*) y 2391 (*Cphsp90-5*) pares de bases que se tradujeron en 699 y 796 aminoácidos respectivamente. Así mismo, ninguna proteína tuvo un peso menos a 80 kDa con puntos isoeléctricos entre 4.9 (*CpHSP90-5*) y 5.65 (*CpHSP90-3*). Al igual que *CpHSP70*, *CpHSP90* presentó ubicación predichas en diferentes compartimientos celulares (Tabla 2.9).

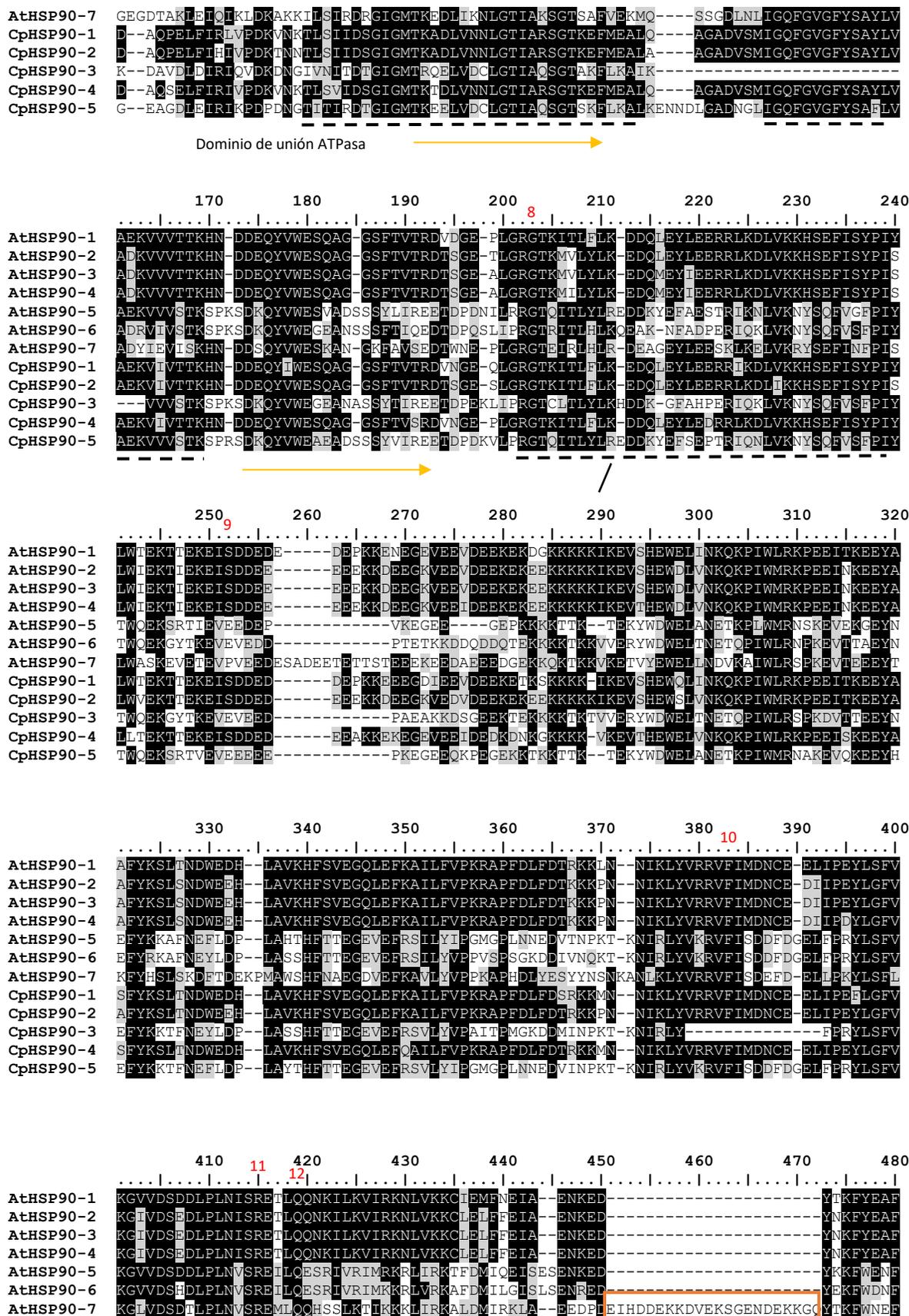
Tabla 2.9. Miembros *hsp90* identificados en *C. papaya*. Se indica el nombre del gen, el ORF, número de aa, peso molecular y la localización predicha de las proteínas.

Nombre	ORF	Aa	Mw (KDa)	pl	Localización predicha
<i>Cphsp90-1</i>	2112	703	80.94	4.96	Citoplasmática
<i>Cphsp90-2</i>	2100	699	80.03	5	Citoplasmática
<i>Cphsp90-3</i>	2328	775	87.91	5.65	Mitocondria
<i>Cphsp90-4</i>	2112	703	80.8	4.99	Citoplasmática
<i>Cphsp90-5</i>	2391	796	90.61	4.9	Cloroplasto

ORF, open reading frame (marco de lectura abierto); aa, aminoácidos; Pm, peso molecular (kDa); pl, punto isoeléctrico

El análisis de dominios entre HSP90 de *Carica* y *Arabidopsis* indicó el dominio de unión ATPasa y la región péptido señal (posición 700-740). Así mismo, todas las proteínas presentaron el motivo característico HSP90 entre la posición 25-60, así como, secuencias características de proteínas HSP90. En el alineamiento, se pudo identificar la firma del retículo endoplasmático de AtHSP90-7 al igual que su motivo conservado al final de la secuencia. Las proteínas HSP90 de *Arabidopsis* y papaya con localización citoplasmática predicha también presentaron el motivo característico al final de la secuencia. Por otro lado, la región de citoquinas de cuatro hélices que está presente en las secuencias HSP90 se encontró en todas las proteínas CpHSP90 como AtHSP90 (figura 2.5). Adicionalmente, los números rojos sobre la alineación muestran los residuos funcionalmente importantes: 1 (ácido glutámico, E) para la hidrólisis de ATP; 2 (ácido aspártico, D) para la unión de ATP; 3, 5, 6, 7 y 8 (glicina, G) para la unión de GA y p23; 4 (lisina, K) para la unión de GA; 9 (serina, S) para la fosforilación por la caseína quinasa II; 10 (fenilalanina, F) para la interacción entre dominios; 11 (arginina, R) y 12 (glutamina, Q) para actividad ATPasa (Li et al., 2020).





```

CpHSP90-1 KGVVSDDLPLNISREMLQONKILKVIKRNKLVKCKEEMFNIEIA--ENKED-----YNKFYEAF
CpHSP90-2 KGVVSDDLPLNISREMLQONKILKVIKRNKLVKCKEEMFNIEIA--ENKED-----YNKFYESF
CpHSP90-3 KGVVSDDLPLNVSREILQESRIVRIMRKRLVRFKAFDMILGSLSENKED-----YEKFWENY
CpHSP90-4 KGVVSDDLPLNISREMLQONKILKVIKRNKLVKCKEEMFNIEIA--ENKED-----YAKFYDAF
CpHSP90-5 KGVVSDDLPLNVSREILQESRIVRIMRKRLVRFKAFDMIQEISESENKED-----YKKEWENE
    
```

Señal del Retículo Endoplasmático

```

          490      500      510      520      530      540      550      560
AtHSP90-1 SKNLKLGIHEDSQNRKTIADLLRYHSTKSGDEMTSEKDYVTRMKEGQKDIIFYITGESKKAVENSPPFLERLKKKGYEVLYM
AtHSP90-2 SKNLKLGIHEDSQNRKTIAE LLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYITGESKKAVENSPPLEKLLKKGIEVLYM
AtHSP90-3 SKNLKLGIHEDSQNRKTIAE LLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNDIFYITGESKKAVENSPPLEKLLKKGIEVLYM
AtHSP90-4 SKNLKLGIHEDSQNRKTIAE LLRYHSTKSGDELTSKDYVTRMKEGQNEIFYITGESKKAVENSPPLEKLLKKGIEVLYM
AtHSP90-5 GRFLKLCIEDTGNHKRITPLLRFFFSKNEEELTSLDEYIENMGENOKAIYYLATDSLKSARSAFFLEKLIQKDI EVLYL
AtHSP90-6 GRFLKLCIEDRENHKKRIAPLLRFFFSQSEEMISLDEYVENMKPEOKAIYYI AADSVTSARDTPPFLERLLEKDI EVLYL
AtHSP90-7 GRSVKLGITIEDAANRNRLAKLRFETTKSDGKLTSLDQYIKRMKKSOKDIIFYITGS SKEQLERKSPFLERLIKKGIEVLYF
CpHSP90-1 SKNLKLGIHEDSQNRKTIADLLRYHSTKSGDEMTSEKDYVTRMKEGQKDIIFYITGESKKAVENSPPFLERLKKKGYEVLFM
CpHSP90-2 SKNLKLGIHEDSQNKSKLAELLLRYHSTKSGDEMTSLKDYVTRMKEGQSDIYYITGESKKAVENSPPLEKLLKKGIEVLFM
CpHSP90-3 GRFLKLCIEDRENHKKRIAPLLRFFFSQSEEMISLDEYVENMKPDQKDIYYI AADSVTSARDTPPFLERLLEKDI EVLYL
CpHSP90-4 SKNLKLGIHEDSQNRKTIADLLRYHSTKSGDEMTSEKDYVTRMKEGQKDIIFYITGESKKAVENSPPFLERLKKKGYEVLFM
CpHSP90-5 GRFLKLCIEDTGNHKRITSLLRFFYSKSEELISLDEYVENMAENOKAIYYLATDSLKSARSAFFLEKLVKDI EVLYL
    
```

```

          570      580      590      600      610      620      630      640
AtHSP90-1 VDAIDEYAVGQLKEYDGKKLVSATKEGLKLED--ETEDEKKKREKKEKSFENLCKTIRKILG--DKVEKVVVSDRIVDSPCC
AtHSP90-2 VDAIDEYAVGQLKEFEFGKKLVSATKEGLKLD--ETEDEKKKREELKEKFEGLCKVIKDVLG--DKVEKVIIVSDRVVDSPPC
AtHSP90-3 VDAIDEYAVGQLKEFEFGKKLVSATKEGLKLD--ETEDEKKKREELKEKFEGLCKVIKDVLG--DKVEKVIIVSDRVVDSPPC
AtHSP90-4 VDAIDEYAVGQLKEFEFGKKLVSATKEGLKLE--ETDEDEKKKREELKEKFEGLCKVIKDVLG--DKVEKVIIVSDRVVDSPPC
AtHSP90-5 VEPIDEVAVQNLQTYKPKKFFVDISKEDLELGLG---DEDEVKREAKQEFNLLCDWIKQQLG--DKVAKVQVSNRLLSSPCV
AtHSP90-6 VEPIDEVAVQNLQTYKPKKFFVDISKEDLELGLG---DEDEVKREAKQEFNLLCDWIKKRLG--DKVAVQVSNRLLSSPCV
AtHSP90-7 TEPVDEYLMQYIMDYEDKKFQVNSKEGLKVGK--DSKDK----ELKEAFKELTKWVKGNLASENVDDVKISNRLADIPCV
CpHSP90-1 VDAIDEYAVGQLKEYDGKKLVSATKEGLKLD--ETEDEKKKREKKEKSFEDLCKVIKDVILG--DKVEKVVVSDRIVDSPCC
CpHSP90-2 VDAIDEYAVGQLKEFEFGKKLVSATKEGLKLD--ESEDEKKKREALKEKFEGLCKVIKDVLG--DKVEKVIIVSDRVVDSPPC
CpHSP90-3 VEPIDEVAVQNLQTYKPKKFFVDISKEDLELGLG---DKNEEKEMMKQEFNLLCDWIKKHLG--DKVAVQVSNRLLSSPCV
CpHSP90-4 VDAIDEYAVNQLKEYDGKKLVSATKEGLKLE--ESEDEKKKREKKEKSFENLCKTIRKILG--DKVEKVVVSDRIVDSPCV
CpHSP90-5 TEPIDEVAVQNLQTYKPKKFFVDISKEDLELGLG---DEDEVKERETKQEYNI LCDWIKQQLG--DKVAKVQVSNRLLSSPCV
    
```

```

          650      660      670      680      690      700      710      720
AtHSP90-1 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSMSGGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRRAEADKNDKSVKDLVLLLYETALLTSGFSL
AtHSP90-2 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSMSAGYMSKKTMEINPENSIMDELRRKRAADKNDKSVKDLVLLIFETALLTSGFSL
AtHSP90-3 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSMSGGYMSKKTMEINPENSIMDELRRKRAADKNDKSVKDLVLLIFETALLTSGFSL
AtHSP90-4 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSNTGGYMSKKTMEINPENSIMDELRRKRAEADKNDKSVKDLVLLIFETALLTSGFSL
AtHSP90-5 LVSCKFGWSANMERLMKAQALGDTSSLEFMRGRRILEINPDHPIIKDLNAACKNAPESTEATRVDLLYDTAIISSGFTF
AtHSP90-6 LVSCKFGWSANMERLMKAQSTGDTISLDYMGRRVLEINPDHSHIKNINAAAYNSNPNEDEAMRAIDMAYDAIIVSSGFTF
AtHSP90-7 VVTSKFGWSANMERIMQSQTLSDANKQAYMRGKRVLEINPRHPIIKELKDRIASDPEDESVKETAQIMYQTLIESGFIL
CpHSP90-1 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSMSGGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRRAEADKNDKSVKDLVLLIFETALLTSGFSL
CpHSP90-2 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSMSAGYMSKKTMEINPENSIMDELRRKRAADKNDKSVKDLVLLIFETALLTSGFSL
CpHSP90-3 LVSCKFGWSANMERLMKQOTVGDTSLEFMRGRRVLEINPEHPIIKDLNAACRNSPDKDAVRAIDLIDLYDTAIVSSGFTF
CpHSP90-4 LVTGEYGTANMERIMKAQALRDSMSAYMASKKTMEINPDNGIVEELRKRRAEVDKNDKSVKDLVLLLYETALLTSGFSL
CpHSP90-5 LVSCKFGWSANMERLMKAQALGDTSSLEFMRGRRILEINPEHPIIKDLNAACKNSPSSDAKQAVDLYDTAIISSGFTF
    
```

Región del péptido señal

```

          730      740      750      760      770      780      790
AtHSP90-1 DEPNTFAARIHRMLKGLSIDDEE--NVVE---DGDMPLEEDDAAEE--SKMEEVD
AtHSP90-2 DEPNTFGSRIHRMLKGLSIDDD--AVEA---DAEMPFLEDDADAE--GSKMEEVD
AtHSP90-3 DEPNTFGSRIHRMLKGLSIDDD--VVEA---DADMPFLEDDADAE--GSKMEEVD
AtHSP90-4 DEPNTFGSRIHRMLKGLSIDDD--AVEA---DAEMPFLEDDADAE--GSKMEEVD
AtHSP90-5 DSPAELGNKIYEMMAMAVGGRWGRVE-----EEEEESTVNEGDDKSGETE--VVE-----PSEVRAESDPWQD
AtHSP90-6 DNPAELGCKIYEMMDVALSGKWSPEVQP-----QQQMAHSHDAETFEAEVVE-----PVEVDGKK
AtHSP90-7 TDEKDFEARIYNSVKSGLNISPFA--VADE---EIEAAEPEPTSEATETKSDDLAGGLNIEAEPVEQQEENIKDEL
CpHSP90-1 DEPNTFAARIHRMLKGLSIDEEE--TAGD---DDMPELEEDGAAE--SKMEEVD
    
```

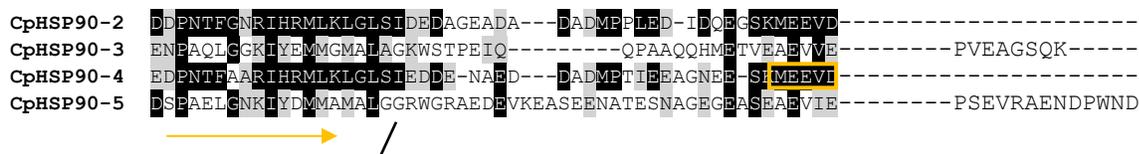


Figura 2.5. Alineamiento de secuencias HSP90 de *C. papaya* (Cp) y *A. thaliana* (At). Las sombras en negro y gris indican conservación en los residuos al 100% y 75% respectivamente, mientras que el fondo blanco corresponde a residuos divergentes. Secuencias características de Hsp90 “ — ”; citoquina de cuatro hélices “ - - - ”. Dominios en el alineamiento señalados con flechas amarillas “ / ”. La caja azul indica el motivo conservado de proteínas HSP90, mientras que la caja naranja y amarilla corresponden a motivos del RE y citosol respectivamente. Los números rojos sobre la alineación muestran los residuos funcionalmente importantes: 1 (ácido glutámico, E) para la hidrólisis de ATP; 2 (ácido aspártico, D) para la unión de ATP; 3, 5, 6, 7 y 8 (glicina, G) para la unión de GA y p23; 4 (lisina, K) para la unión de GA; 9 (serina, S) para la fosforilación por la caseína quinasa II; 10 (fenilalanina, F) para la interacción entre dominios; 11 (arginina, R) y 12 (glutamina, Q) para actividad ATPasa.

HSP90 de papaya presentó 20 motivos conservados que contenían entre 14 y 50 aminoácidos. Los motivos 1-3 y 5-14 estuvieron presentes en todas las secuencias HSP90. Según la localización subcelular predicha; citoplasma, retículo endoplasmático, mitocondria o cloroplasto, se pudo comprobar que las proteínas compartían los mismos motivos (figura 2.6). Todas las secuencias presentaron más de 17 motivos conservados.

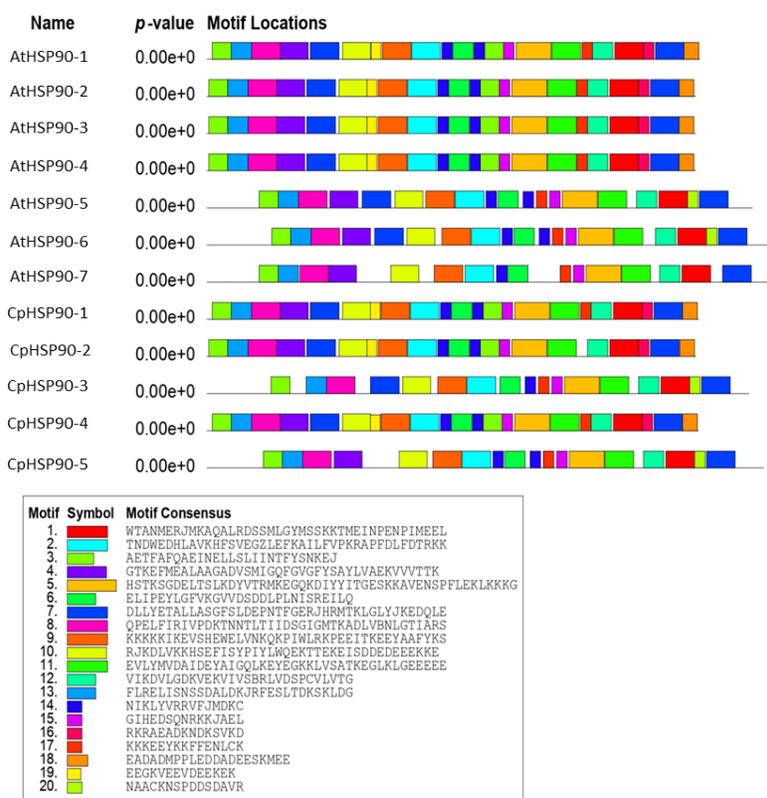


Figura 2.6. Motivos conservados y valor p de HSP90 de *C. papaya* y *A. thaliana*.

2.3.3 Análisis filogenético y tablas de divergencia de las secuencias proteicas HSP encontradas en *C. papaya* y *A. thaliana*.

Las secuencias proteicas AtHSP17.8, PtHSP17.8 y CpHSP17.8-1 al 5 se utilizaron para construir el árbol filogenético junto con la tabla de divergencia evolutiva entre especies. El árbol se dividió en 2 clados y el outgroup (AT4G38630). El primer clado esta, a su vez, dividido en 2 subclados. El primer subclado está conformado por PtHSP17.8, CpHSP17.8-4, CpHSP17.8-5, CpHSP17.8-3, mientras que el segundo subclado lo conforman CpHSP17.8-1 y 2. El segundo clado, está conformado por AtHSP17.8 (Figura 2.7).

A partir de su traducción a proteína, se realizaron tablas de divergencia evolutiva para cada familia HSP entre *A. thaliana*, *P. trichocarpa* y *C. papaya*. El resultado arrojó porcentajes de identidad altos entre todas las secuencias (74-96%), sobresaliendo CpHSP17.8-4 y CpHSP17.8-5 con igual porcentaje de identidad de 85.53 y 81.05 para *P. trichocarpa* y *A. thaliana* respectivamente (tabla 2.10). Así mismo, se observó que el porcentaje de identidad entre proteínas HSP17.8 de Papaya fue mayor al 83%. Obteniéndose, el mayor porcentaje de identidad entre CpHSP17.8-5 con CpHSP17.8-4 de 96.75%, mientras que el menor porcentaje de identidad (75.51) se obtuvo entre CpHSP17.8-2 con PtHSP17.8, lo que concuerda con los resultados del árbol filogenético.

En base a los porcentajes de identidad, tomando en cuenta que PtHSP17.8 ha sido reportado como inducible por alta temperatura, se seleccionó los genes ***Cphsp17.8-2*** y ***Cphsp17.8-3*** para evaluarlos en este trabajo.

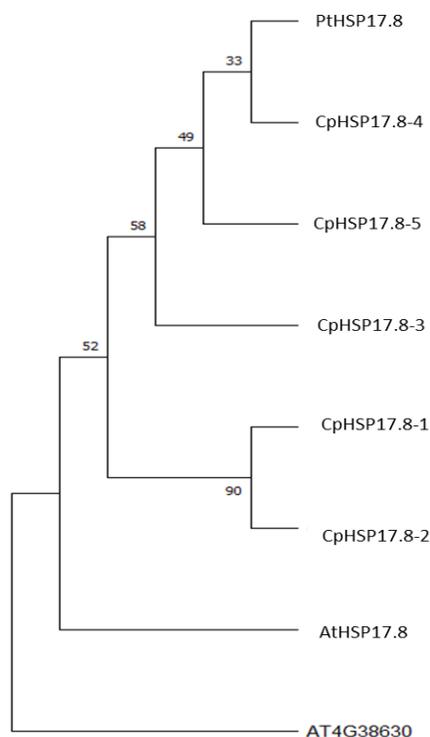


Figura 2.7. Árbol filogenético entre secuencias proteicas HSP17.8 de *A. thaliana*, *P. trichocarpa* y *C. papaya*. La construcción filogenética se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximum Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó LG model con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5.

Tabla 2.10. Porcentajes de identidad entre secuencias proteicas HSP17.8 de *A. thaliana*, *P. trichocarpa* y *C. papaya*. En amarillo se muestran los porcentajes de identidad de las HSP17.8 de *C. papaya* escogidas.

	POTRI.009G049 800.1	At1G07 400	CpHSP17. 8-1	CpHSP17. 8-2	CpHSP17. 8-3	CpHSP17. 8-4
POTRI.009G049 800.1						
At1G07400	74.34					
CpHSP17.8-1	75.50	78.29				
CpHSP17.8-2	73.51	76.32	92.16			
CpHSP17.8-3	82.89	78.43	83.66	83.01		
CpHSP17.8-4	85.53	81.05	84.97	84.97	90.91	
CpHSP17.8-5	85.53	81.05	87.58	86.93	92.21	96.75

Para construir el árbol filogenético de Hsp70, se utilizaron las secuencias traducidas CpHSP70-1 al 10 de papaya junto con las secuencias descritas para *Arabidopsis*. El árbol se dividió en 2 clados más el outgroup. El primer clado está dividido a su vez en 2 subclados, el primer subclado está conformado por secuencias HSP70 de *Arabidopsis* descritas como citoplasmáticas junto con las secuencias CpHSP70-1, 6, 7 y 8. Estos hallazgos concuerdan con la localización predicha de las proteínas HSP70 de carica papaya (tabla 2.8), al igual que con el alineamiento proteico

(figura 2.3), en donde estas secuencias mostraron el motivo conservado EEVD correspondiente con dicha localización. El segundo subclado, conformado por el resto de las proteínas HSP70 restantes de *Arabidopsis* y papaya, se dividió según su localización celular. De esta manera, la proteína CpHSP70-3 se agrupó con las proteínas AtHSP70-11, 12 y 13 de *Arabidopsis* clasificadas como del retículo endoplasmático. Así mismo, la proteína CpHSP70-2 se agrupó con las proteínas AtHSP70-7 y 6 correspondientes al cloroplasto, mientras que la proteína CpHSP70-5 y 10, se agruparon con las proteínas AtHSP70-10 y AtHSP70-9 clasificadas como mitocondriales. Por otro lado, el segundo clado, lo conformaron las proteínas AtHSP70-14 al 16 junto con las proteínas CpHSP70-4 y CpHSP70-9, que, si bien su localización celular corresponde al citoplasma, estas corresponden a la subclasificación Hsp110/SSE que posee firmas conservadas de HSP70. Estos resultados concuerdan con el peso molecular predicho de las proteínas CpHSP70-4 y 9 de 89.01 kDa y 92.4 kDa respectivamente (figura 2.8).

Así mismo, las proteínas agrupadas según su localización subcelular concuerdan con las firmas o motivos conservados correspondientes a ese compartimiento según lo encontrado en el alineamiento proteico. Por ejemplo: las secuencias mitocondriales agrupadas en el segundo subclado del árbol presentaron la firma: GDAWVEA correspondiente a la mitocondria, mientras que, los grupos de proteínas citoplasmáticas y del cloroplasto del árbol filogenético presentaron los motivos EEVD y DVIDADFTDS en el alineamiento proteico.

La tabla de divergencia para la familia HSP70 entre *C. papaya* y *A. thaliana*, mostró valores de identidad altos y bajos según la comparación entre secuencias (tabla 2.8). Por ejemplo, CpHSP70-1, 6, 7 y 8 mantiene porcentajes de identidad altos >82% con las secuencias AtHSP70-1,2,3,4,5 y 18, mientras que, con los genes restantes descritos para *Arabidopsis*, su porcentaje de identidad es <64%. Esto concuerda con el análisis filogenético entre ambas especies, pues CpHSP70-1, 6, 7 y 8 está dentro del subclado de localización citoplasmática. Así mismo, los porcentajes de identidad entre las secuencias proteicas CpHSP70-3 y AtHSP70-11 al 13 correspondientes al retículo endoplasmático son mayores al 80%, lo que se comprueba con el análisis filogenético, pues entre más se alejan del árbol, su porcentaje de identidad es <60%. Lo mismo ocurre, para las demás subclados agrupados según su localización celular.

A partir de los resultados del árbol filogenético, se procedió a seleccionar los genes que, por divergencia evolutiva compartían mayor porcentaje de identidad con aquellos HSP70 de *Arabidopsis* descritos como altamente inducibles por calor, localizados en el citoplasma

(AtHSP70-1, 4 y 5). Por lo tanto, los genes codificantes para HSP70 de *C. papaya* a evaluar en este trabajo serán: *Cphsp70-1*, *Cphsp70-6*, *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8*.

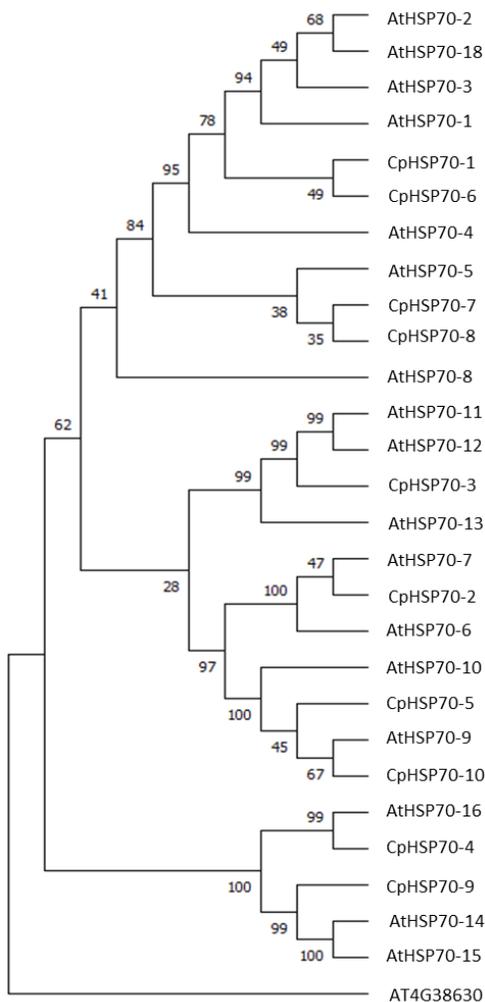


Figura 2.8. Árbol filogenético entre secuencias proteicas HSP70 de *A. thaliana*, y *C. papaya*. La construcción filogenética se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximun Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó LG model con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5.

Tabla 2.11. Porcentajes de identidad entre secuencias HSP70 de *A. thaliana* y *C. papaya*. En amarillo se muestran los porcentajes de identidad de las HSP70 de *C. papaya* escogidas.

	AtHSP70-1	AtHSP70-2	AtHSP70-3	AtHSP70-4	AtHSP70-5	AtHSP70-6	AtHSP70-7	AtHSP70-8	AtHSP70-9	AtHSP70-10	AtHSP70-11	AtHSP70-12	AtHSP70-13	AtHSP70-14	AtHSP70-15	AtHSP70-16	AtHSP70-18	CpHSP70-1	CpHSP70-2	CpHSP70-3	CpHSP70-4	CpHSP70-5	CpHSP70-6	CpHSP70-7	CpHSP70-8	CpHSP70-9	
AtHSP70-1																											
AtHSP70-2	94.16																										
AtHSP70-3	92.91	91.68																									
AtHSP70-4	91.67	90.45	91.02																								
AtHSP70-5	83.05	82.48	82.55	85.05																							
AtHSP70-6	47.07	47.63	47.30	47.54	47.52																						
AtHSP70-7	46.90	47.54	47.13	47.45	46.56	92.16																					
AtHSP70-8	31.77	31.39	31.77	32.14	32.02	27.49	27.36																				
AtHSP70-9	49.84	47.99	48.71	48.95	48.54	52.89	52.97	28.76																			
AtHSP70-10	50.81	49.92	50.16	50.08	49.84	53.39	52.07	28.95	80.48																		
AtHSP70-11	63.58	63.69	64.72	63.62	62.92	47.14	46.90	28.13	49.52	50.63																	
AtHSP70-12	63.21	63.32	64.35	63.25	62.60	46.90	46.75	27.94	49.92	50.55	98.80																
AtHSP70-13	61.49	60.66	62.32	62.28	62.78	47.99	47.59	28.73	49.34	49.84	79.91	79.44															
AtHSP70-14	28.46	28.06	28.86	28.35	28.96	26.31	25.99	20.38	26.09	26.62	28.96	29.17	29.84														
AtHSP70-15	29.36	28.81	29.63	29.29	29.83	26.19	26.62	20.38	26.42	27.07	28.60	28.82	30.22	87.36													
AtHSP70-16	27.20	26.65	27.29	26.81	27.73	24.40	24.76	21.65	25.49	25.94	27.72	27.77	28.27	52.37	49.57												
AtHSP70-18	89.47	89.79	87.52	87.03	80.03	48.08	48.08	30.83	49.92	49.75	63.30	62.97	61.27	29.52	29.65	26.94											
CpHSP70-1	93.51	91.98	91.63	94.28	84.84	48.01	47.69	31.77	49.19	50.49	64.20	63.82	62.03	29.23	30.07	27.17	89.63										
CpHSP70-2	47.14	47.54	46.82	47.29	47.52	89.73	88.72	27.73	53.04	52.58	47.37	47.44	47.58	26.07	26.53	23.80	47.58	47.76									
CpHSP70-3	64.40	63.72	65.08	64.60	63.75	47.43	46.74	28.49	50.56	51.27	92.77	92.77	80.47	28.39	28.67	27.30	63.78	64.03	47.43								
CpHSP70-4	26.46	25.75	27.01	26.22	26.51	23.80	24.32	19.00	25.53	25.49	26.92	26.97	28.11	52.03	48.12	72.47	26.16	26.11	23.68	26.98							
CpHSP70-5	50.73	49.52	50.00	50.32	50.16	52.96	52.52	28.76	81.64	87.35	49.29	49.53	49.42	26.71	27.63	24.84	50.42	51.06	52.73	49.76	24.71						
CpHSP70-6	93.82	91.67	91.63	93.21	84.09	47.63	47.87	31.58	48.39	49.84	63.72	63.35	61.55	28.95	30.07	26.97	89.47	97.38	47.46	64.03	26.22	50.49					
CpHSP70-7	82.10	81.38	81.92	83.46	84.06	46.35	45.95	32.02	48.63	49.11	63.05	62.83	62.06	27.94	28.91	27.04	79.55	84.96	46.90	64.66	26.61	49.76	84.67				
CpHSP70-8	85.69	83.90	83.80	87.06	86.07	47.63	46.92	31.26	49.28	50.40	64.58	64.52	63.61	28.39	29.31	27.86	82.79	87.79	46.76	65.72	27.12	51.05	86.77	87.25			
CpHSP70-9	27.81	27.72	27.42	27.86	28.64	26.33	26.01	19.72	25.20	26.24	27.99	27.87	28.71	81.76	75.90	50.94	29.03	28.27	25.77	27.56	51.93	25.83	27.84	27.61	28.07		
CpHSP70-10	49.52	47.83	48.54	48.79	48.38	52.44	52.30	28.20	85.00	83.26	49.05	49.13	48.85	26.50	26.72	24.96	49.08	49.03	52.80	49.68	25.16	87.06	48.47	49.11	49.36	25.79	

El árbol filogenético de HSP90 fue construido con las secuencias proteicas de los genes descritos para *Arabidopsis* y los genes encontrados en *C. papaya*. El árbol se dividió en 2 clados más el outgroup. El primer clado, conformado por proteínas descritas como citoplasmáticas, está a su vez dividido en dos subclados. En el primer subclado se agruparon las proteínas AtHSP90-3, 4 y 2 junto con CpHSP90-2, mientras que en el segundo subclado se agruparon las proteínas AtHSP90-1 con CpHSP90-1 y 4. Estos resultados concuerdan con la localización predicha de las proteínas HSP90 de papaya (tabla 2.9) al igual que con el alineamiento proteico, en el cual estas proteínas presentaron el motivo MEEVD correspondiente a dicha localización. El segundo clado, a su vez, dividido en dos subclados, el primero conformado por AtHSP90-7 que corresponde al retículo endoplasmático, y el segundo subclado agrupado según su localización celular, cloroplasto: AtHSP90-5 y CpHSP90-5 y mitocondria: AtHSP90-6 y CpHSP90-3 (figura 2.9).

Los porcentajes de identidad obtenidos a partir de la tabla de divergencia entre la familia Hsp90 de *Carica* y *Arabidopsis* indicó valores altos y bajos según su agrupación por compartimientos celulares (tabla 2.12). Por ejemplo, las secuencias de AtHSP90 y CpHSP90 citoplasmáticas ubicadas en el primer clado tienen un porcentaje de identidad >82%. De igual manera, las proteínas del cloroplasto (AtHSP90-5 y CpHSP90-5) tuvo un porcentaje de identidad de 86.63%, así mismo, las proteínas HSP90 de la mitocondria (AtHSP90-6 y CpHSP90-3) comparten el 75.93% de identidad. Por el contrario, AtHSP90-7 del retículo endoplasmático tuvo porcentajes de identidad <51% con respecto a las proteínas HSP90 de papaya.

Al igual que con HSP70, a partir de los resultados del árbol filogenético, se seleccionó genes que codifican para HSP90 de *C. papaya* que compartían mayor porcentaje de similitud con los genes reportados como, inducibles por calor en *Arabidopsis*, con su localización en el citoplasma. Por lo que, los genes *hsp90* a evaluar en este trabajo serán: ***Cphsp90-1*** y ***Cphsp90-4***.

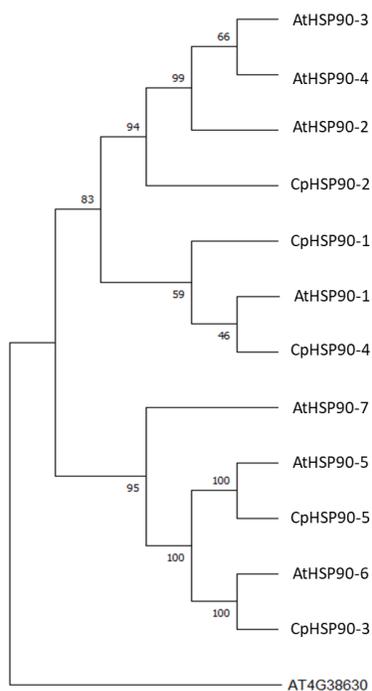


Figura 2.9. Árbol filogenético entre secuencias proteicas HSP90 de *A. thaliana*, y *C. papaya*. La construcción filogenética se realizó en el programa MEGA11, con el método Maximun Likelihood y prueba Bootstrap con 1000 réplicas. Como modelo de sustitución se utilizó LG model con Distribución Gamma y un número de categorías igual a 5.

Tabla 2.12. Porcentajes de identidad entre secuencias proteicas HSP90 de *A. thaliana*, *P. trichocarpa* y *C. papaya*. En amarillo se muestran los porcentajes de identidad de las HSP90 de *C. papaya* escogidas.

	AtHS P90-1	AtHS P90-2	AtHS P90-3	AtHS P90-4	AtHS P90-5	AtHS P90-6	AtHS P90-7	CpHS P90-1	CpHS P90-2	CpHS P90-3	CpHP S90-4
AtHS P90-1											
AtHS P90-2	87.82										
AtHS P90-3	87.68	99.14									
AtHS P90-4	86.82	97.42	97.71								
AtHS P90-5	46.79	46.19	46.04	46.04							
AtHS P90-6	45.18	44.06	44.06	44.20	64.25						
AtHS P90-7	51.43	50.29	50.14	50.29	43.50	42.89					

CpHS P90-1	93.03	86.80	86.66	85.51	45.92	44.52	50.57				
CpHS P90-2	88.09	93.27	92.98	91.55	45.89	44.64	51.23	89.37			
CpHS P90-3	44.24	42.81	42.81	42.66	64.65	75.93	41.14	43.38	42.81		
CpHS P90-4	90.47	82.93	82.78	82.78	46.06	44.81	51.29	90.04	85.92	43.54	
CpHS P90-5	46.68	46.37	46.22	46.22	86.63	62.93	43.98	45.81	46.08	65.36	46.53

2.3.4 Modelado tridimensional de proteínas seleccionadas para cada familia HSP de *C.papaya*

A partir del análisis de los árboles filogenéticos para cada familia HSP, se realizó el modelado de proteínas a las secuencias seleccionadas para HSP17.8, HSP70 y HSP90, así como, de las proteínas HSP moldes de *Arabidopsis* reportadas como inducibles por altas temperaturas. En el caso de HSP17.8 también se realizó el modelado para PtHSP17.8.

La estructura tridimensional de HSP17.8 de *C. papaya* y *A. thaliana* mostró la arquitectura tetraédrica característica de las sHSP en su forma nativa. Las proteínas escogidas mostraron sus láminas β -plegadas localizadas en el dominio α -cristalino (figura 2.10). A pesar de que las sHSP son monómeros relativamente pequeños, en su estado nativo, la mayoría existe como oligómeros de múltiples subunidades. Los monómeros de las sHSP se dimerizan incorporando una hoja plegada β_6 de un monómero en la región “ β sánduche” del dominio α -cristalino, de sus siglas en inglés ACD. El dodecámero finalmente se ensambla en una arquitectura tetraédrica con cada dímero formando un borde del tetraedro (Waters et al., 2021).

Por otra parte, la estructura tridimensional de HSP70 de *C. papaya* y *A. thaliana* mostro su estructura secundaria con α -hélices en la posición 516-609 correspondiente al dominio C-terminal, mientras que el dominio de unión al sustrato en la posición 417-550 presentó láminas β -plegadas. Todas las estructuras CpHSP70 mostraron el mismo modelo tridimensional a las proteínas AtHSP70, evidenciando la alta conservación de estas proteínas entre diferentes especies de plantas y reinos.

Las proteínas HSP90 son dímeros cuyos protómeros están unidos entre sí a través de los extremos C-terminales. El dominio N-terminal está formado de una lámina β -plegadas en un extremo con un grupo de α -hélices en el otro, delimitando el sitio de unión al ATP (posición 26-200). Por su parte el dominio intermedio presenta una conformación α - β - α entre los residuos 273-409. El dominio C-terminal está constituido por una lámina β -plegada, seguida de α -hélices. Al

igual que HSP70, las estructuras tridimensionales predichas para CpHSP90 presentaron el mismo modelo que las proteínas AtHSP90.

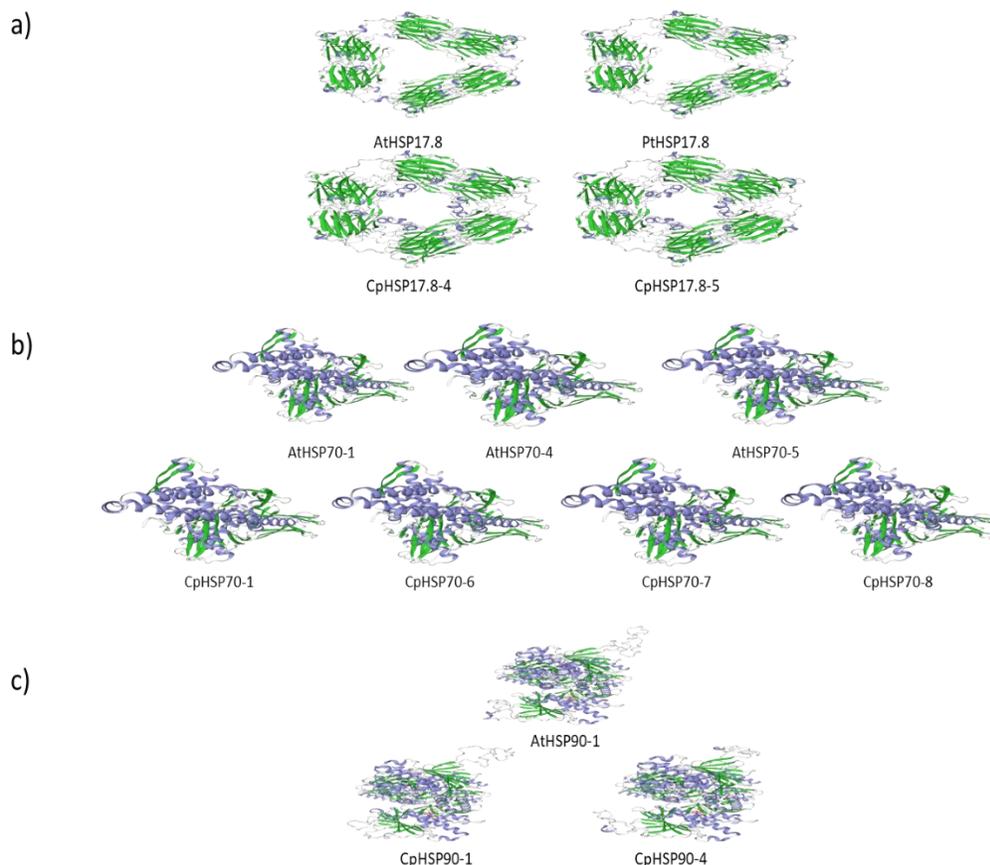


Figura 2.10. Modelado tridimensional de proteínas seleccionadas. a) CpHSP17.8, b) CpHSP70 y c) CpHSP90, con el programa en línea Swiss-Model: <https://swissmodel.expasy.org/>.

2.3.5 Diseño de oligonucleótidos para genes *Cphsp17.8*, *Cphsp70* y *Cphsp90*.

Se realizó el diseño de oligonucleótidos de 8 genes: 2 *Cphsp17.8*; 4 *Cphsp70* y 2 *Cphsp90*. La secuencia, la longitud, el porcentaje de Guanina:Citocina y el tamaño del amplicón se detallan en la tabla 2.13.

Tabla 2.13. Diseño de oligonucleótidos para genes *Cphsp17.8*, *Cphsp70* y *Cphsp90*.

Gen		Secuencia	Longitud (pb)	Tm° C	%C G	Amplicón (pb)
<i>Cphsp17.8-2</i>	Forward	GGAGGAGGAGGAGAAGAACG	20	62	60	134
	Reverse	CAGTGAGCACCCCATTTTCC	20	62	55	

Cphsp17.8-3	Forward	TCCCCTTCTCTTCCTCGTCA	20	62	55	103
	Reverse	AGATCCGCCTTGAAGACGTG	20	62	55	
Cphsp70-1	Forward	ACCGTCTTACGTCGCCTTCAC	21	62	57.1	125
	Reverse	CGCTGAATCTCCGACCAATC	20	62	55	
Cphsp70-6	Forward	GGAGAGGGTCCTGCTATTGG	20	62	60	121
	Reverse	CGTATGACGGCGTAGTCCTG	20	62	60	
Cphsp70-7	Forward	AGGAACCAGTTGGCAGAAGTTG	22	61	50	115
	Reverse	CCATAGGCGGCACATCAGTA	20	61	55	
Cphsp70-8	Forward	CGGACTACTCCCTCTTATGT	20	62	50	133
	Reverse	CAGAGAAGCGTCTTCCAATC	20	62	50	
Cphsp90-1	Forward	ACCAAGAGTGGAGACGAATGG	21	62	52.4	130
	Reverse	GTCGCTCCAAGAATGGTGAGT	21	62	52.4	
Cphsp90-4	Forward	GCCTGAGGAGATTTCAAAGGA	20	62	50	119
	Reverse	ATGGCCTGGAAGCTCAAGCTG	18	62	50	

2.4 DISCUSIÓN

En plantas, las Heat Shock Proteins han sido reportadas como chaperonas moleculares que se unen a proteínas mal plegadas, previenen la formación de agregados, inducen un correcto plegamiento y finalmente, facilitan un correcto funcionamiento celular bajo condiciones de estrés. Adicionalmente, entender la respuesta de las plantas ante alta temperatura es de vital importancia para su desarrollo. Por lo tanto, es necesario identificar genes involucrados en respuesta al choque térmico en plantas.

Una de las sHSP reportadas como inducible por alta temperatura es HSP17.8. Al no existir una base de datos que reporte una clasificación detallada de miembros de cada familia HSP de *C. papaya* var SunUp, se tomó como referencia la HSP17.8 de *P. trichocarpa* reportada como inducible durante estrés por calor, adicional a la HSP17.8 del modelo de planta *A. thaliana*. Según Ming., (2008) a pesar de que *C. papaya* posee una relación evolutiva más estrecha con *Arabidopsis*, comparte un mayor número de genes *P. trichocarpa*, relacionados con la expansión celular o síntesis de lignina, lo que es consistente con el tamaño de la planta y la evolución convergente del hábito arbóreo respectivamente.

Las plantas poseen diferente número de genes que codifican sHSP dirigidas a diferentes compartimientos celulares. Bajo esta característica existen 11 subclases para sHSP en angiospermas: citosol I, II, III, IV, V; retículo endoplasmático, mitocondria y cloroplasto. A partir de secuencias HSP17.8 molde ubicadas en el citoplasma, se obtuvo que la localización subcelular predicha para las proteínas HSP17.8 de papaya correspondían a este mismo compartimiento. Así mismo, el peso molecular predicho entre 17.55 (CpHSP17.8-5)-17.68 (CpHSP17.8-3) kDa y pI entre 5.74 (CpHSP17.8-1) y 6.14 (CpHSP17.8-2) corresponde con lo reportado por Li et al., (2016) para HSP17.8 de *P. trichocarpa*.

Adicionalmente, el análisis de dominios mostró el motivo conservado para la subclase citosólica I (CI). Las sHSP CI y RE de diferentes mono y dicotiledóneas presentan un motivo conservado entre 10 y 13 aminoácidos. El dominio α -cristalino consiste en ~90 aminoácidos que comprenden un sándwich de siete β -hebras compactas que forman el núcleo estructural de todas las sHSP. El dominio N-terminal, al inicio de las secuencias posee una longitud variable <85 aminoácidos. Por otro lado, la región C-terminal, seguida del dominio α -cristalino es pequeña, entre 13-18 aminoácidos (Li et al., 2016; Waters et al., 2021). Los resultados obtenidos, indican que CpHSP17.8 de papaya se conserva estructuralmente y podría tener funciones celulares similares a los miembros sHSP citosol I de otras especies.

La arquitectura del dodecamero encontrada en modelaje tridimensional de proteínas HSP17.8 de papaya, *Arabidopsis* y *Populus* ha sido documentada anteriormente para cuatro subclases de sHSP, citosólica I: Hsp16.9 de trigo (CAA45902), HSP18.1 de guisante (P19243), HSP17.6 de *Arabidopsis* (At1g53540) y citosólica II: HSP17.8 de trigo (AF350423), HSP 17.7 de guisante (AAA33670) y HSP17.7 de *Arabidopsis* (At5g12030) lo que confirma la alta similitud en los residuos de aminoácidos entre proteínas sHSP de diferentes especies (Waters et al., 2021; Pandey et al., 2015).

La identificación de genes *hsp70* se considera importante debido a que estas proteínas juegan un papel crucial tanto, en procesos de desarrollo de la planta como, en condiciones de estrés biótico o abiótico. Varios miembros HSP70 han sido identificados en diferentes especies de plantas como: *Arabidopsis* (Lin et al., 2001), arroz (Sarkar et al., 2012), tomate (Li et al., 1999) o plátano (Vanhove et al., 2015). Sin embargo, se desconoce cuántos miembros Hsp70 existen en *C. papaya*.

Los genes *hsp70* reportados para la planta modelo *Arabidopsis* se utilizaron como molde (query) para encontrar genes *hsp70* en *C. papaya* var Sun up. Un total de 10 genes *Cphsp70* a partir de 18 genes *AtHsp70* fueron identificadas en este estudio. Si bien, el genoma de *C. papaya* var Sun up es tres veces más grande que el de *Arabidopsis*, este contiene menor número de genes funcionales, que puede ser debido a una falta de duplicación genómica reciente (Ming et al., 2008). Esto explicaría el menor número de genes encontrados para *hsp70* y *hsp90*. Resultados similares se han encontrado en trabajos previos dentro del grupo de investigación (Giron et al., 2015; Idrovo et al., 2013)

Según el análisis filogenético y localización subcelular predicha realizada en este estudio se encontraron 6 genes codificantes para HSP70 de papaya ubicadas en el citoplasma (CpHSP70-1, 6, 7 y 8), 2 proteínas pertenecientes a la subfamilia HSP110 (CpHSP70-4 y 9), una proteína con localización en el retículo endoplasmático (CpHSP70-3), una proteína ubicada en el cloroplasto (CpHSP70-2) y 2 proteínas dentro de la mitocondria (CpHSP70-5 y 10). Las proteínas CpHSP70 que comparten misma localización celular presentaron mayor relación evolutiva (% de identidad), lo que es consistente con la noción de que genes ortólogos *hsp70* de diferentes compartimientos celulares están más conservados que los genes parálogos en los genomas respectivos (Guo et al., 2016). De la misma manera, el análisis de motivos indicó que la distribución de motivos similares en cada gen está estrechamente relacionada con su ubicación celular, lo que sugiere que estos podrían tener la misma función dentro de una subfamilia (Rehman et al., 2020)

Las proteínas HSP110 se incluyen dentro de la familia HSP70 por su alta homología de secuencia. Su mayor tamaño y peso molecular se debe a la región acídica insertada en el dominio de unión al sustrato o una extensión en el dominio C-terminal (Guo et al., 2016). Por otro lado, la divergencia filogenética entre miembros HSP70, así como sus roles característicos pueden estar estrechamente relacionados con su ubicación en diferentes compartimientos celulares.

Si bien la proteína AtHSP70.8 tiene su localización en el cloroplasto, existe una gran variación en su secuencia ya que esta no presentó el motivo conservado correspondiente a este compartimiento celular en el alineamiento proteico. Así mismo, según el árbol filogenético publicado por Lin et al., (2001), esta proteína no se agrupa con las demás proteínas de esta localización celular, por lo que el autor describe a este gen como el más alejado entre todos los miembros de la familia de genes que es solo ~25% similar a la mayoría de los otros AtHSP70. Lo publicado por el autor, concuerda con los resultados encontrados en este trabajo, ya que,

según la tabla de divergencia, AtHSP70 posee un porcentaje de identidad <32% con respecto a las demás proteínas HSP70 de *A. thaliana* y *C. papaya*, al igual que su ubicación fuera del grupo de proteínas AtHSP70-6 y 7.

Por otro lado, se ha reportado que las proteínas HSP90 están involucradas en el correcto plegamiento de quinasas, factores de transcripción, transducción de señales de estrés y reparación del ADN (Song et al., 2019). A pesar de que se han identificado varios miembros HSP90 de diferentes especies de plantas, no existe estudios de HSP90 en *C. papaya*.

En el presente estudio se identificó 5 genes *hsp90* en *C. papaya* a partir de 7 genes *hsp90* reportadas en la planta modelo *A. thaliana*. A partir del árbol filogenético junto con el análisis de localización predicha, 3 proteínas (CpHSP90-1, 2 y 4) se ubicaron en el citoplasma, una proteína (CpHSP90-5) se localizó en el cloroplasto y una proteína (CpHSP90-3) con localización en la mitocondria. Adicionalmente, el pI de CpHSP90 estuvo entre 4.9 (CpHSP90-5) y 5.65 (CpHSP90-3) sugiriendo proteínas ácidas, lo que es consistente con los resultados para *A. thaliana*, tomate y tabaco (Krishna et al., 2001; Song et al., 2019).

Dentro de las funciones que cumple HSP90 al ser una chaperona destaca: permitir el plegamiento y activación, facilitar la unión específica entre una proteína diana y su ligando, y favorece el ensamblaje. En su conformación nativa, el dominio N-terminal posee un segmento en forma de tapa que, durante el cambio conformacional, la estructura de la proteína pasa de estado abierto (unida al ADP) ha cerrado (unida al ATP), influyendo en la afinidad de Hsp90 por las proteínas sustrato. En el dominio intermedio, existe una región o lazo anfipático entre los residuos 329-339 que está implicado en la interacción con la proteína diana (Ali., et al 2006).

El mecanismo de acción de esta proteína se basa en los cambios conformacionales de su estructura terciaria debido a la unión con ATP y la actividad ATPasa. En su forma inactiva, los dominios N-terminal poseen una conformación abierta sin interaccionar, a manera de “pinza”. Cuando se une al ATP, la proteína sustrato se une a su vez al dominio intermedio y los monómeros se aproximan y se enrollan entre sí, alcanzando su conformación cerrada. Después de la hidrólisis, los dominios N se separan, retomando la conformación abierta, liberando el sustrato activado junto con ADP + Pi y estableciendo un ciclo de hidrólisis del ATP (Ali., et al 2006).

HSP90 forma distintos complejos proteicos que actúan como reguladores de los cambios conformacionales que favorecen o impiden el proceso. Uno de ellos descritos por Bourguine &

Guihur., (2021) establece la interacción con HSP70 cuando existe estímulo de estrés por alta temperatura. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de regulación de esta proteína debido a que no está elucidado cómo se produce la asociación con otras proteínas para formar complejos y qué le aporta, en concreto, al mecanismo de acción.

Los resultados respaldan que los genes identificados en este trabajo constituyen un importante recurso genético que codifican HSP involucradas en el correcto plegamiento de proteínas en condiciones normales y bajo condiciones de estrés.

2.5 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se identificaron y caracterizaron por primera vez de manera *in silico* genes que codifican para la proteína CpHSP17.8, y las familias CpHSP70 y CpHSP90 en *C. papaya* a partir de los genes ortólogos descritos para *A. thaliana*.

Carica papaya contiene al menos 5, 10 y 5 genes que codifican para la familia CpHSP17.8, CpHSP70 y CpHSP90, respectivamente, cuyas proteínas están ubicadas en diferentes compartimientos celulares, lo que sugiere distintos roles funcionales *in vivo*.

El alineamiento de secuencias para cada CpHSP17.8 indicó el dominio α -cristalino característico de las small heat shock proteins con las regiones consenso I y II, así como el motivo perteneciente a la clase citosólica I (NTD CI). Por su parte, para la familia CpHSP70 se identificó los 3 dominios funcionales (dominio de unión ATPasa, dominio de unión al sustrato y dominio C-terminal) al igual que las 3 firmas características de la familia. Cada proteína presentó los mismos motivos conservados según su ubicación subcelular. Finalmente, se encontró el dominio de unión ATPsa y la región péptido señal para la familia CpHSP90, así como, los motivos característicos de su localización (Citoplasma, MEEVD; Retículo Endoplasmático, KDEL).

El modelamiento de proteínas comprobó que las CpHSP17.8 mostraban láminas β -plegadas localizadas en el dominio α -cristalino. Por su parte, la familia CpHSP70 presentó α -hélices en correspondientes al dominio C-terminal y láminas β -plegadas del dominio de unión al sustrato. Los miembros de la familia CpHSP90 presentaron las láminas β -plegadas en un extremo con un grupo de α -hélices en el otro correspondiente al dominio N-terminal. Por su parte el dominio intermedio presentó una conformación α - β - α y el dominio C-terminal estuvo constituido por una lámina β -plegada, seguida de α -hélices. Al igual que las demás CpHSP, las estructuras

tridimensionales predichas para cada CpHSP (HSP17.8, HSP70 y HSP90) presentaron el mismo modelo estructural que las proteínas moldes de *A. thaliana*, AtHSP (HSP17.8, HSP70 y HSP90).

CAPÍTULO III. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *C. papaya* cv Maradol y Silvestre ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA

3.1 INTRODUCCIÓN

Debido al calentamiento global las plantas, intentan minimizar los efectos de la alta temperatura al activar mecanismos de respuesta para tratar de defenderse de los daños causados por el incremento de calor como, por ejemplo: daño en la membrana celular y conformación de las proteínas, estrés oxidativo debido a la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o cambios en la organización de estructuras celulares. Adicionalmente, el aparato fotosintético sufre daños, la tasa de transpiración y conductancia disminuyen debido al cierre de estomas para evitar la pérdida de agua, inhibición de enzimas fotosintéticas, reducción en la expansión de las hojas, pérdida de turgencia y aceleración de la senescencia. Por lo que, para mitigar tales efectos, se altera el metabolismo y fisiología de la planta. Una de las respuestas es la acumulación de azúcares, metabolitos y enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POT) y catalasa (CAT) para sobrevivir a periodos de estrés y evitar daños mayores (dos Santos et al., 2022).

Los procesos fisiológicos en las plantas como: la germinación, crecimiento, respiración, fotosíntesis, transporte, tropismo, entre otros, también se ven afectados ante diversos factores o condiciones desfavorables. Por lo que, distintos parámetros fisiológicos se han utilizado como indicadores cuantitativos del estado de las plantas bajo estrés biótico o abiótico, en los que se incluyen: eficiencia máxima del fotosistema II, medido como F_v/F_m , índice de rendimiento PI_{abs} , intercambio gaseoso o relaciones hídricas, la mayoría de estos son no destructivos y pueden ser medidos varias veces durante fases experimentales (Meetam et al., 2020; Fuzy et al., 2019). Sin embargo, organismos mejor adaptados o tolerantes, por razones evolutivas, a condiciones desfavorables, son capaces de modular los mecanismos de respuesta a favor de su defensa para superar las condiciones de estrés y volver a su metabolismo basal. Estos mecanismos de respuesta fisiológica inician con la percepción del estrés que desencadenará una cascada de señales moleculares que terminan en cambios a nivel fisiológico, bioquímico y de desarrollo (dos Santos et al., 2022).

El daño causado a la cadena de transporte de electrones del fotosistema I y II se puede evaluar a través de la medición de la fluorescencia rápida de la clorofila a, la fluorescencia retardada de la clorofila a y la reflexión modulada de 820nm. La cinética de la fluorescencia rápida y retardada

dependen directamente del estado redox del PSII (P680), mientras que la reflexión modulada es una función del estado redox del PSI (P700). Al funcionar PSI y PSII de forma coordinada con una serie de transportadores de electrones de la cadena de transporte de electrones, cualquier fluctuación dentro de sus componentes puede alterar de forma directa o indirecta la cinética de fluorescencia. Por lo tanto, se obtiene información sobre toda la cadena de transporte de electrones: lado donante del PSII, transferencia de e^- entre PSII y PSI y el lado aceptor del PSI (Chen et al., 2021).

En plantas, la emisión de fluorescencia está a cargo de las moléculas de clorofila *a* asociadas a los fotosistemas I y II (PSI y PSII). Por lo tanto, la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila puede utilizarse para obtener información acerca de la eficiencia fotoquímica y la disipación de la energía absorbida en forma de fotón (Moreno et al., 2008).

El índice de rendimiento (PI) provee información acerca del estado general de las plantas y su vitalidad. De manera específica, es el producto de la concentración de centros de reacción por clorofila, un parámetro relacionado con fotoquímica primaria y otro relacionado con transporte de electrones. Por lo tanto, PI brinda información acerca de cambios en las propiedades de antena, eficiencia de la captura o transporte de electrones que van más allá de la plastoquinona primaria Q_A (Kalaji et al., 2016)

Por otro lado, la fuga de electrolitos es un indicador de estabilidad de la membrana celular, así como, de la condición y resiliencia potencial de las células vegetales (Fuzy et al., 2019). Durante estrés abiótico, las membranas celulares es una de las primeras y principales estructuras afectadas, por lo que mantener su integridad y estabilidad bajo estas condiciones es considerado como mecanismo de tolerancia en plantas (Bajji et al., 2001). Los primeros estudios realizados en medir la fuga de electrolitos sugirieron que este estaba relacionado con el daño a la membrana celular por degradación oxidativa de la bicapa de lípidos o defectos mecánicos. Por lo que resulta en un parámetro fisiológico que puede inducir respuestas de defensa ante condiciones ambientales (Bajji et al., 2001)

De la misma manera, el agua, es el recurso más importante para el crecimiento y funcionamiento de las plantas, y, al mismo tiempo, la mayor limitante de la producción agrícola (Taiz & Zeiger 2002). El potencial hídrico (Ψ_w) es una medida de la energía libre del agua por unidad de volumen (J/m^3) equivalente a unidades de presión como el pascal o mega Pascal (MPa). Al ser una medida

influenciada por factores de concentración, presión y gravedad, resulta un buen indicador del estado general de la planta (Taiz & Zeiger 2002).

Durante condiciones de estrés, las plantas acumulan diferentes osmolitos, como: L-prolina, glicina betaina, manitol, glicerol, sorbitol, entre otros (Sharma et al., 2019). Estos osmolitos contribuyen con la eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como, cambian la presión osmótica de la célula al mantener el agua sin comprometer el metabolismo normal, actuando como osmoprotectores (Sharma et al., 2019). Además de su papel como osmolito, la prolina, es un aminoácido esencial para el metabolismo primario, su acumulación en el citoplasma hace que actúe como chaperona molecular al amortiguar el pH citosólico y mantener el estado redox de la célula. Por lo que, diversos estudios señalan su papel para estimular la tolerancia ante estrés abiótico en plantas (Meena et al., 2019; Sharma et al., 2019).

De manera que en el presente capítulo se evaluó el efecto de estrés por alta temperatura en las respuestas fenotípicas y en una batería de parámetros fisiológicas que incluyeron: parámetros fotosintéticos, de fluorescencia, integridad de membrana, potencial hídrico y contenido de prolina, que permitieran definir el grado de termo tolerancia de plantas de papaya comercial y silvestre.

3.2.1 Material vegetal

Las semillas del genotipo Maradol fueron adquiridas de la casa comercial Semillas del Caribe. Por otro lado, las semillas del genotipo silvestre se obtuvieron a partir de una recolección previa de frutos de poblaciones silvestres nativas encontradas en sitios poco perturbados de diferentes localidades del Estado de Yucatán (Bautista, 2020).

3.2.1.1 Tratamiento pre-germinativo

Un total de 50 semillas de cada genotipo fueron sometidas a un tratamiento pre germinativo según el protocolo reportado por Muñozcano y Martínez (2008), con modificaciones realizadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular. Las semillas fueron remojadas en agua destilada durante 15min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con solución KNO_3 (50g L^{-1}) por 48h a 30°C con agitación constante, la decantación de la solución se realizó cada 24h. Una vez finalizado los lavados, se procedió a colocar las semillas en ácido giberélico (400ppm) por 3h a 35°C .

3.2.1.2 Germinación de semillas *C. papaya* cv Maradol y Silvestre

Las semillas, con tratamiento pre germinativo, se pasaron a compartimientos cerrados dentro de franelas estériles a 35°C (dentro del invernadero). Al cabo de 4 días se observó que las semillas comienzan a romper la testa. Finalmente, después de 6 días, semillas con una radícula de más de 0.5mm se pasaron a charolas de plástico con 50 cavidades que contenían sustrato estéril (Peat moss y Agrolita en relación 1:1) humedecido previamente con fungicida Carbendazim (5mL L⁻¹) para prevenir posibles plagas. Durante la etapa en charolas el riego consistió en 10mL de agua por cavidad cada 24h durante 45 días.

3.2.1.3 Aclimatación de plantas *C. papaya*

Al cumplir los 45 días de edad, las plántulas se transfirieron a bolsas negras de invernadero con sustrato (tierra, peat moss y agrolita en relación 1:1:1). El riego de las plantas se mantuvo cada 24h con 50mL de agua a temperatura promedio de 28 ± 2°C durante 70 días y fotoperiodo de 13h luz y 11h obscuridad.

3.2.2 Ensayo de estrés por alta temperatura

Se seleccionaron plantas jóvenes Maradol y silvestre de 115 días de edad con morfología similar (altura y número de hojas). Para el ensayo térmico, descrito en la figura 7, se utilizó una cámara térmica de 91.5cm de largo con 41.5cm de ancho y 61cm de profundidad, diseñada en el laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular (Bautista, 2020). Los tratamientos control consistieron en; un grupo de plantas en condiciones de invernadero (28 ± 2°C), un grupo control de la cámara térmica sometido a 25°C por 2h y su recuperación después de 168h a 28 ± 2°C en invernadero con riego constante (50mL de agua cada 24h). El tratamiento de estrés térmico se realizó a 50°C por 2h dentro de la cámara térmica y su recuperación se evaluó después de 168h a 28 ± 2°C en invernadero con riego constante.

3.2.3 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

3.2.3.1 Fluorescencia de clorofila

Como indicadores del rendimiento fotosintético de la planta, los parámetros de fluorescencia variable y fluorescencia máxima (Fv/Fm), así como, el índice de rendimiento (potencial) PI_{abs} se midieron con el equipo M-PEA, de sus siglas en inglés (Multifunctional plant efficiency analysis), Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK.

Para la medición, una hoja seleccionada de cada repetición se adaptó a la obscuridad utilizando un clip especial de hoja por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo en obscuridad, el sensor óptico se adaptó a la región del clip ubicado en la parte adaxial de la hoja para iniciar la medida. Adicionalmente, la cinética de la fluorescencia de la clorofila o curvas OJIP se realizaron a través del programa SigmaPlot 11.0 con los valores de fluorescencia a través del tiempo con la finalidad de evaluar el comportamiento de los fotosistemas PSII y PSI.

3.2.3.2 Intercambio gaseoso

La tasa fotosintética de las hojas se determinó a través de un analizador de gases en el espectro infrarrojo, IRGA (LI-6400XT portátil *LI-COR*, Nebraska, USA). Para las mediciones, una hoja de cada repetición se colocó dentro de la cámara con un área de 6 cm², bajo un flujo constante de CO₂ de 350 μmolCO₂mol⁻¹. Los parámetros del programa precargado en el equipo se mantuvieron iguales, a excepción de la temperatura del bloque, misma que se modificó a 30°C en condiciones de invernadero. Una vez iniciada la medida se esperaron unos segundos para que la misma pueda estabilizarse e iniciar las lecturas de: fotosíntesis (μmolCO₂m⁻²s⁻¹), conductancia (molH₂Om⁻²s⁻¹), transpiración (mmolH₂Om⁻²s⁻¹) y CO₂ intercelular (μmolCO₂mol⁻¹).

3.2.3.3 Potencial hídrico

El potencial hídrico (Ψ) se midió con el equipo WP4C, potenciómetro de punto de rocío, (Decagon Devices, USA). Se tomó una muestra de hoja de 4cm de diámetro con ayuda de un sacabocado por cada repetición, estas se midieron una por una dentro de la cámara sellada del equipo a 25°C.

3.2.3.4 Porcentaje de pérdida de electrolitos

La integridad de la membrana plasmática puede estimarse a través de la fuga de electrolitos. Para determinar el porcentaje de pérdida de electrolitos se realizaron 3 cortes en forma de disco de 0.7mm de diámetro a una hoja seleccionada por cada repetición. A continuación, los discos se colocaron en frascos de vidrio con 30mL de agua destilada. La conductividad inicial C₁ (μS/cm), generada por los electrolitos liberados se midió con el potenciómetro (ORION modelo 162, USA). Posteriormente, los discos fueron autoclavados para generar el daño total de la membrana plasmática. Después de que los frascos estuvieran fríos, se tomó la medición final C₂. Finalmente, el porcentaje de electrolitos se evaluó con la siguiente fórmula: % fuga de electrolitos = (C₁/C₂) * 100.

3.2.4 Contenido de Prolina

El contenido de prolina se realizó a través de espectrofotometría según el protocolo de (Bates et al., 1973) con modificaciones. Se pesaron 120mg de hoja y se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 5mL de ácido sulfosalicílico al 3% para después centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos. Un mililitro de sobrenadante se incubó con 1mL ninhidrina ácida y 1mL de ácido acético glacial a 96°C por 1h. La reacción se detuvo con baño de hielo por 5 minutos, después de este tiempo se añadieron 2mL de tolueno para, seguido, realizar vortex por 20 segundos. Los tubos se dejaron reposar por 5 minutos para que las fases puedan separarse. Finalmente, se tomó la fase orgánica de cada muestra y se midió a 520nm utilizando como blanco 1mL de tolueno. Para la cuantificación de prolina se realizó una curva estándar con L-Prolina en concentraciones de 0.025 a 0.4 μ M.

3.2.5 Evaluación estadística

Los datos obtenidos de cada prueba fisiológica y cuantificación del contenido de prolina se analizaron a través del software R con el paquete R commander. La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilk. De acuerdo con la distribución normal de los datos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA $P < 0.05$) o un Modelo Lineal Generalizado (GLM $p < 0.05$) para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Como prueba de comparación de medias se empleó la prueba de Duncan. De esta forma, con cada prueba fisiológica la hipótesis alternativa planteada fue que, existían diferencias significativas entre tratamientos, para cada genotipo Maradol y silvestre: temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), cámara térmica (25°C), postratamiento o recuperación ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), o que, por el contrario, las medias de los tratamientos no presentaban diferencias, considerada como la hipótesis nula.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 RESPUESTA FENOTÍPICA DE *C. papaya* ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA

Para los ensayos de estrés térmico se utilizaron plantas jóvenes (115 días) de *C. papaya* cv Maradol y silvestre que fueron sometidas a 50°C por 2 horas dentro de una cámara térmica. La temperatura problema ha sido evaluada previamente en el laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular (Bautista, 2020; Alcocer, 2013).

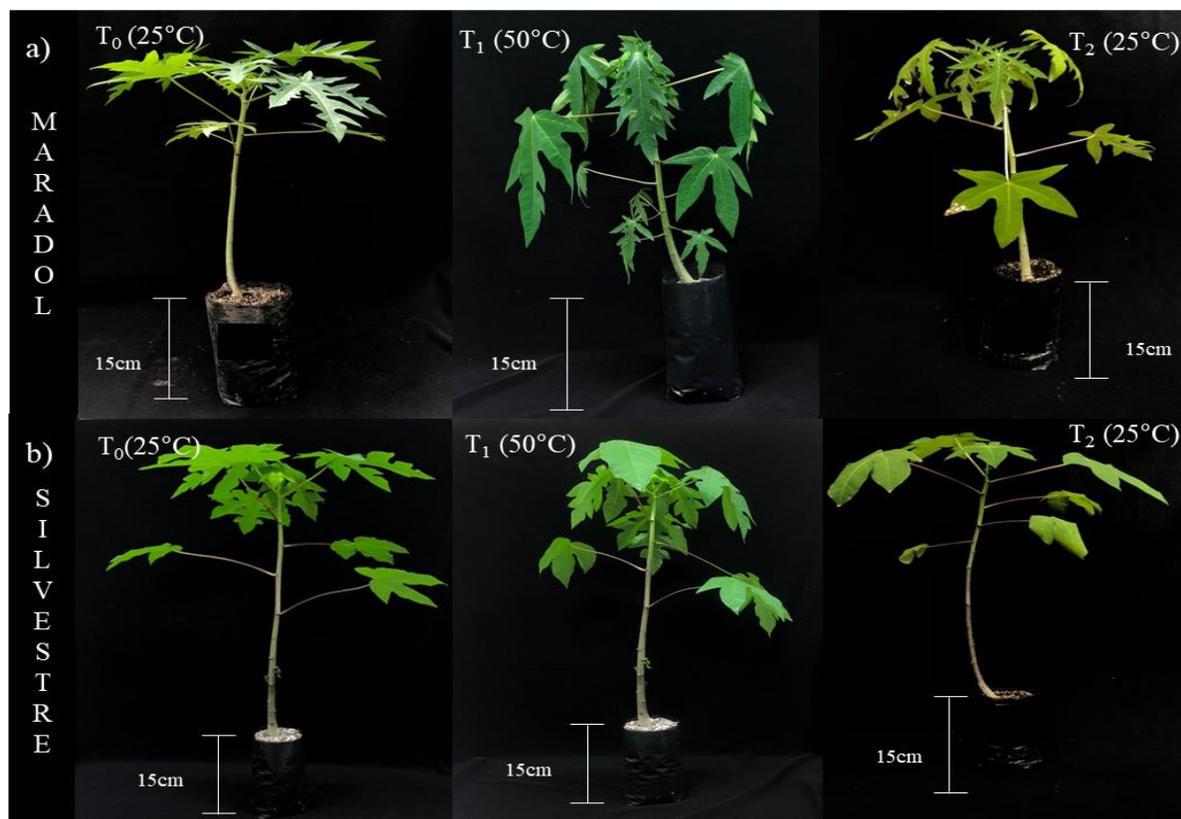


Figura 3.1. Respuesta fenotípica en plantas jóvenes de *C. papaya Maradol* y *Silvestre* ante estrés por alta temperatura a tiempo T₀ (25°C), tiempo de exposición T₁ de 2h (50 °C) y tiempo de recuperación T₂ de 168h (25°C).

Como se observa en la figura 3.1 T₁ las plantas jóvenes después de 2h de estrés térmico (50°C) presentaron notables alteraciones en su estado fenotípico. Las hojas de ambos genotipos mostraron pérdida de turgencia, enrollamiento y en el caso del genotipo Maradol, marchitamiento del tejido en comparación con el grupo control (figura 3.1 T₀). Sin embargo, estos cambios morfológicos fueron más evidentes en el genotipo Maradol a diferencia del genotipo silvestre (figura 3.1 a y b). Después de 168h de recuperación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en invernadero y riego constante se evidenció que existe mejor recuperación de la turgencia en las hojas del genotipo silvestre a diferencia del genotipo Maradol, cuyas hojas presentaban mayor decaimiento y menor recuperación de turgencia que el genotipo silvestre.

3.3.3 RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *C. papaya* cv Maradol y silvestre ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA.

3.3.3.1 Eficiencia máxima del fotosistema II e índice del rendimiento PI_{abs}

La eficiencia máxima del fotosistema II, medido como F_v/F_m , e índice de rendimiento PI_{abs} son indicadores indirectos del rendimiento cuántico del fotosistema II. Ante esto, al realizar el análisis de estadístico para la relación F_v/F_m , la prueba de análisis de datos ($p < 0.05$) señaló que existieron diferencias significativas entre distintos tratamientos (figura 3.2 a). La prueba de diferencia de medias de Duncan señaló que el grupo control en invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y caja (25°C) así como la recuperación ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) para ambos genotipos se mantuvo con medias superiores a 0.74 sin presentar diferencia entre ellos. Sin embargo, después de 2h a 50°C , se observó una disminución en la emisión de fluorescencia siendo 0.56 para el genotipo Maradol y 0.64 para el genotipo silvestre, ambos estadísticamente igual pero diferentes a sus controles ($p = 0.00345$).

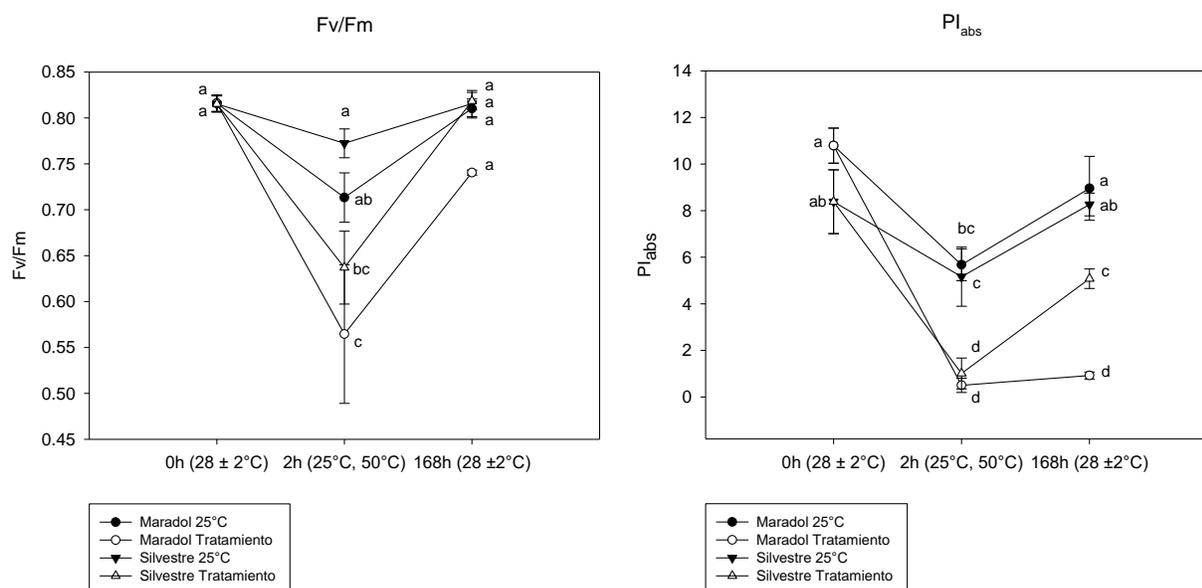


Figura 3.2. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) e Índice rendimiento PI_{abs} en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos.

Por otro lado, el análisis de datos para el índice de rendimiento PI_{abs} indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) con $p = 0.000000755$. Para el grupo control de invernadero se obtuvieron valores iniciales de índice PI_{abs} de 10.79 y 8.38 Maradol y silvestre, respectivamente. Durante su exposición a 25°C en la cámara térmica se observó que este valor

disminuyó para ambos genotipos (5.67 Maradol y 5.16 silvestre). Sin embargo, después del estrés a 50°C estos valores disminuyeron notablemente para ambos genotipos, siendo de 0.50 para Maradol y 1.01 para silvestre. Durante el periodo de recuperación se observó que el grupo control de la cámara recupera sus valores de índice PI_{abs} (8.95 Maradol y 8.26 silvestre). Por otro lado, el genotipo Maradol no presentó incremento del rendimiento de su fotosistema (PI_{abs} 0.92) siendo igual al periodo de estrés, mientras que el genotipo silvestre incrementó su rendimiento después de 168h a 5.07, siendo diferente significativamente que su variedad comercial (figura 3.2 b).

3.3.3.2 Cuantificación del rendimiento del fotosistema II a través de curvas O-J-I-P

Al exponer a la luz una muestra fotosintética adaptada a la obscuridad permite obtener una curva de inducción de fluorescencia de clorofila polifásica (O-J-I-P transitoria) que provee información de la actividad fotosintética del PSII y la reducción de la plastoquinona. El incremento de la fluorescencia de la clorofila presenta cuatro inflexiones: O, corresponde al valor mínimo de fluorescencia (F_0) en este momento todos los centros de reacción están oxidados. J, que ocurre a los 2ms (F_{2ms}), se relaciona con la reducción parcial de QA. I, se desarrolla a los 20ms (F_{20ms}) y se relaciona con la reducción parcial de QA y QB. Por último, P, representa el valor máximo de fluorescencia (F_m) donde todos los centros de reacción están reducidos. PI_{abs}

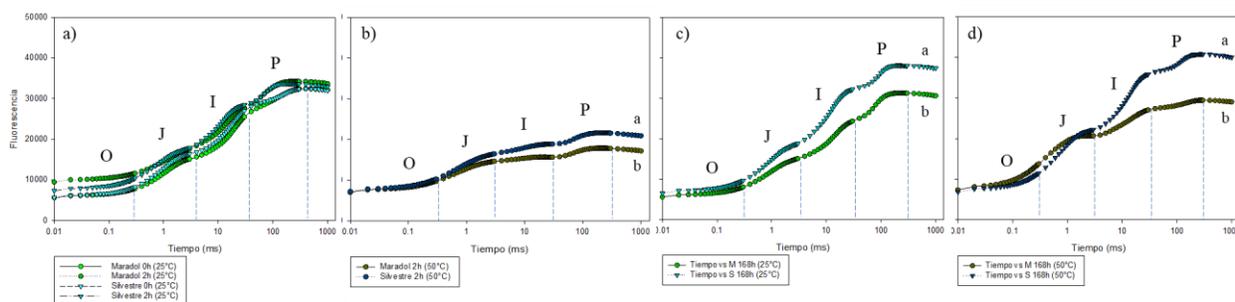


Figura 3.3. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila polifásica (O-J-I-P transitoria) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura. a) tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y exposición de 2h a 25°C , b) tiempo de exposición 2h a 50°C , c) tiempo de recuperación 2h a 25°C + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y d) tiempo de recuperación 2h a 50°C + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Diferentes letras minúsculas corresponden a diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos.

Al realizar el análisis de datos ($p < 0.05$) se observó que los grupos control a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y cámara térmica (25°C) no presentaron diferencias en sus curvas O-J-I-P (figura 3.3 a). Sin embargo, después del tratamiento a 50°C , si bien, la emisión de fluorescencia se ve afectada para ambos genotipos, el genotipo silvestre presentó menor afectación en su PSII, con una media de 16003.18 a diferencia del genotipo Maradol con una media de 13876.45

($p=3.11e^{-15}$) (figura 3.3 b). Después del periodo de recuperación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, los valores del grupo control se mantienen dentro de lo normal, con medias de 22982.55 para silvestre y de 18323.08 Maradol, sin presentar diferencias con los grupos control a temperatura de invernadero y cámara térmica (Figura 3.3 a y c), cabe mencionar que el genotipo silvestre presentó mejores niveles de fluorescencia que su variedad comercial. Por otro lado, al finalizar el periodo de recuperación para los tratamientos a 50°C , se observó que existen diferencias significativas ($p=1.99e^{-14}$) entre genotipos. Silvestre presentó mejor recuperación de la actividad del PSII con media de 25554.02 en relación con el genotipo Maradol, con una media de 21298.06 (Figura 3.3 d).

3.3.3.3 Fotosíntesis, conductancia estomática (g_s), transpiración y CO_2 intercelular (C_i)

Después de realizar el análisis de datos ($p<0.05$), los resultados obtenidos para fotosíntesis indicaron que los grupos control a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y cámara (25°C) se mantuvieron sin diferencias significativas entre genotipos con medias superiores a $9.73 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figura 3.4. a). Sin embargo, después del periodo de estrés, la fotosíntesis del genotipo Maradol decae significativamente con respecto a su control y al genotipo silvestre ($p = 2.09e^{0.7}$) presentando valores de 0.18 y $3.94 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Después del periodo de recuperación se evidenció que existe diferencia significativa entre genotipos ($2.97 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Maradol y $6.38 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ silvestre). Se pudo observar que la fotosíntesis para ambos genotipos se vio afectada, debido a que, aunque exista un incremento después del periodo de recuperación esta no regresó a niveles control.

Por otra parte, al realizar el análisis de datos ($p<0.05$) se observó que los valores de conductancia se mantienen a niveles similares entre los genotipos Maradol y silvestre en los grupos control presentando medias igual a $0.48 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $0.38 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente en invernadero y de $0.45 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $0.40 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente dentro de la cámara a 25°C (figura 3.4 b). Después del periodo de estrés, se observó que la conductancia del genotipo silvestre incrementa a $1.41 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ siendo significativamente diferente a los demás tratamientos. Al finalizar el periodo de recuperación, se observó que ambos genotipos retoman niveles de conductancia iguales a los niveles control. Maradol presentó una media de $0.067 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ y silvestre de $0.128 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ sin presentar diferencias entre ambos.

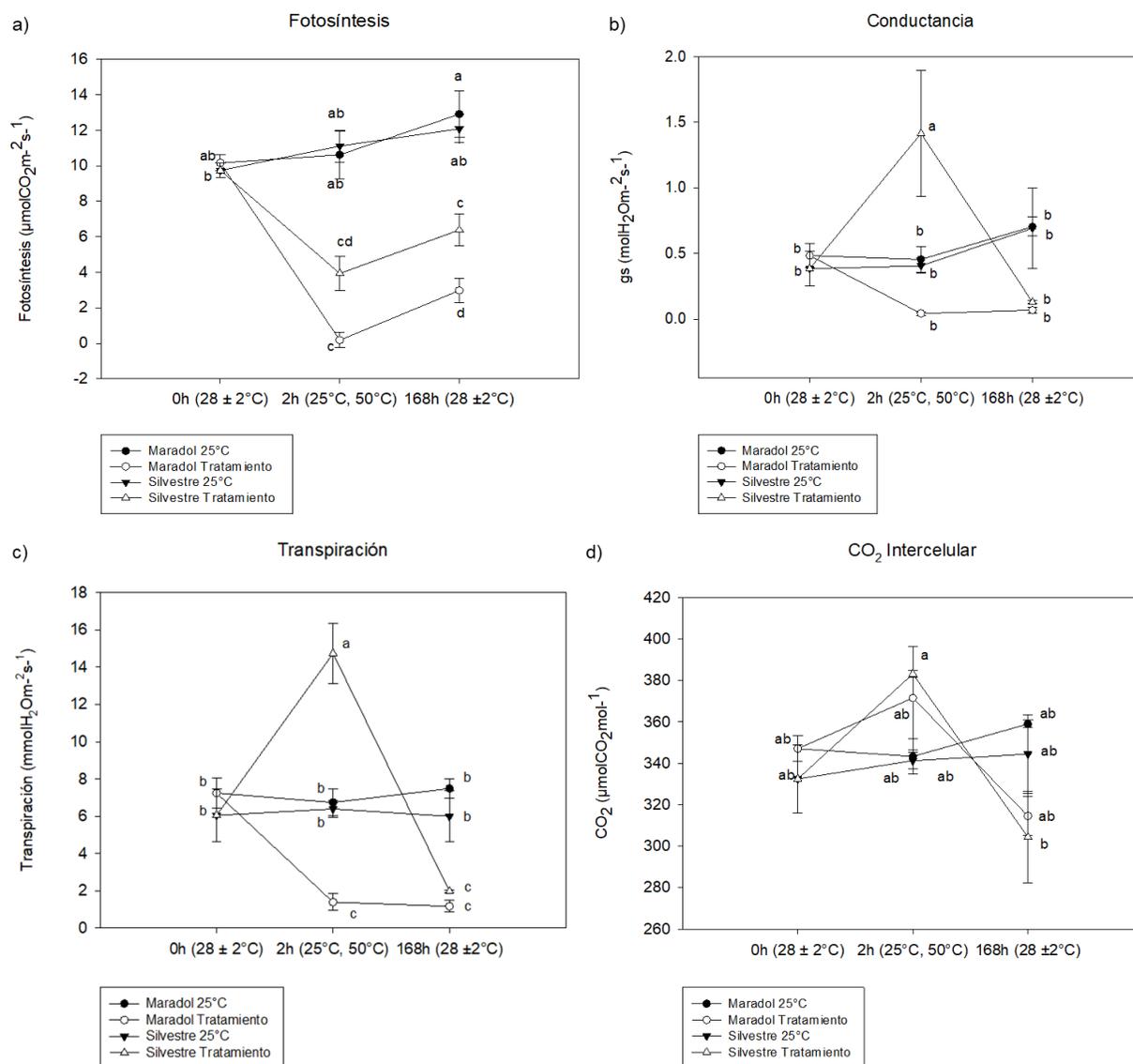


Figura 3.4. a) Fotosíntesis ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), b) conductancia estomática ($\text{molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$), c) transpiración ($\text{mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$) y d) CO_2 Intercelular ($\mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos.

La tasa de transpiración en hojas del genotipo Maradol y silvestre comenzaron con medias de $7.24 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $6.05 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), mismas que se mantuvieron en cámara a 25°C con medias de $6.73 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $6.39 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente sin presentar diferencias entre genotipos (GLM $p < 0.05$). Al finalizar el tiempo de estrés, la transpiración en el genotipo silvestre ($14.73 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$) aumentó significativamente ($p = 0.000016$) en relación con sus controles, mientras que, la

transpiración en el genotipo Maradol ($1.38 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$) disminuyó significativamente ($p=0.00105$) siendo diferente entre tratamientos. Después de 168h de recuperación con riego constante, ambos genotipos presentaron disminución en su transpiración ($1.16 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ Maradol y $1.96 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$ silvestre) siendo diferente en relación con sus controles (figura 3.4 c).

Adicionalmente, el análisis de datos ($p<0.05$) para el flujo de CO_2 intercelular (C_i) presentó que los valores de C_i se mantienen constantes a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y cámara térmica (25°C) con medias sobre $343.29 \mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$ para el genotipo Maradol y 341.27 para el genotipo silvestre. Después de 2h de estrés a 50°C , los datos indicaron un incremento de C_i , sin embargo, no existieron diferencias entre genotipos y controles ($371.52 \mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$ Maradol y $383.18 \mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$ silvestre). Finalmente, después de 168h de recuperación a temperatura de invernadero, el grupo control no presentó diferencias entre genotipos con valores de 359.02 para Maradol y 344.42 para silvestre. De igual manera, los tratamientos a 50°C no presentaron diferencias entre genotipos con relación a sus controles (figura 3.4 d).

3.3.3.4 Potencial hídrico de hojas *C. papaya* cv Maradol y silvestre

El movimiento de agua en las plantas, medido como potencial hídrico, se mantuvo sin diferencias significativas ($p<0.05$) para los grupos control a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), cámara térmica (25°C) y recuperación ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) con valores mayores a -0.84 MPa (figura 3.5). Después de 2h a 50°C , se observó que el potencial hídrico del genotipo Maradol disminuyó a -1.22 MPa , siendo significativamente diferente ($p=0.017$) al genotipo silvestre con -0.80 MPa . Es importante destacar que, durante el estrés por calor, el genotipo silvestre mantuvo un potencial hídrico similar al grupo control (0.79 MPa) sin presentar diferencias significativas.

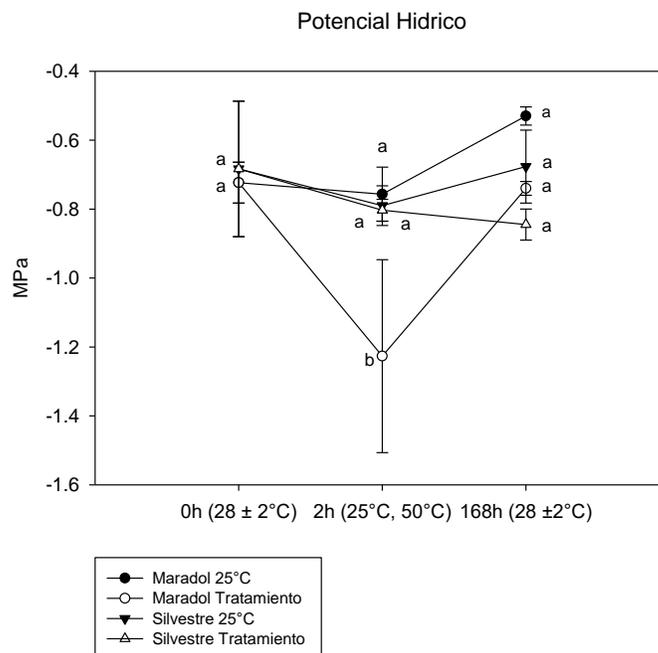


Figura 3.5. Potencial Hídrico (MPa) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura (Anova $p < 0.5$) a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos.

3.3.3.5 Porcentaje de fuga de electrolitos en hoja de *C. papaya* cv Maradol y silvestre.

La estabilidad e integridad de la membrana celular se pueden evaluar a través de la pérdida de electrolitos. Ante esto, el análisis de datos ($p < 0.05$) indicó que no existen diferencias significativas entre genotipos a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y cámara térmica (25°C) con medias mayores a 16.95 para el genotipo Maradol y de 15.05 para el genotipo silvestre. Después del tratamiento de estrés a 50°C , se observó que el porcentaje de fuga de electrolitos se incrementó para ambos genotipos, sin embargo, el genotipo Maradol presentó mayor pérdida de electrolitos (44.43) que el genotipo silvestre (29.85) con $p = 0.0000211$. Posterior al periodo de recuperación, se observó que ambos genotipos disminuyen la pérdida de electrolitos en hojas, sin presentar diferencias con relación al grupo control (figura 3.6).

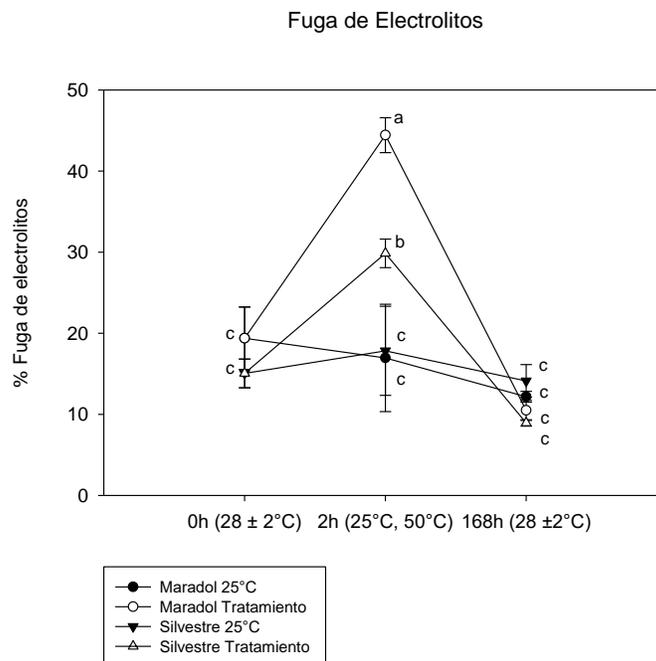


Figura 3.6. Pérdida de electrolitos (%) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos.

3.3.3.6 Contenido de prolina libre en hojas de *C. papaya* cv Maradol y silvestre

La prolina presenta un carácter *zwitterion* o ion dipolar, que, bajo condiciones de estrés, se acumula en el citoplasma de las células sin interferir con la estructura celular o el metabolismo. A temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), los genotipos Maradol y silvestre presentaron contenido de prolina con medias de 11.52 mg/g y 14.87 mg/g respectivamente, durante el periodo en cámara térmica a 25°C y su recuperación después de 168h se observó que los valores se mantenían, sin presentar diferencias significativas (Figura 3.7). Posterior al tratamiento de 50°C se observó que ambos genotipos acumulan prolina durante el periodo de estrés siendo de 26.11 mg/g para Maradol y de 25.11 mg/g para silvestre. De igual manera, se observó que después del periodo de recuperación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, ambos genotipos continuaban acumulando prolina con medias de 23.25 mg/g Maradol y 22.60 silvestre, a diferencia de sus controles (9.61 mg/g Maradol y 11.60 mg/g silvestre).

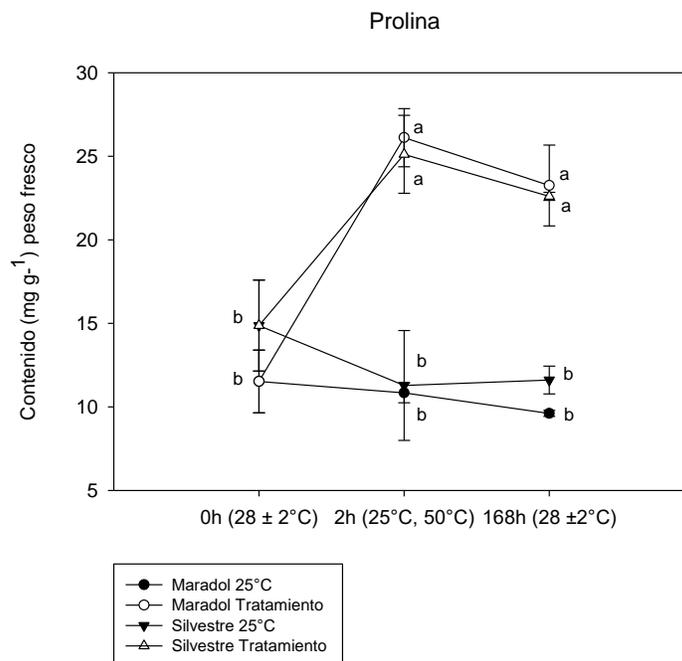


Figura 3.7. Contenido relativo de prolina (mg/g peso fresco) en plantas de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos.

3.4 DISCUSIÓN

Dentro de su ambiente físico, las plantas enfrentan diversos tipos de condiciones climáticas adversas, que, debido a ser organismos sésiles, dependen de sus procesos internos para sobrevivir a los cambios en el entorno externo (Yadav et al., 2020). Ante temperaturas elevadas se presentan distintos daños fenotípicos, como: quemaduras de hojas y tallos, abscisión y senescencia de hojas, inhibición del crecimiento de nuevos brotes, así como, de raíces, daño de frutos o aborto floral, lo que resultará en bajos rendimientos del cultivo (Bita & Gerats., 2013).

Por los resultados obtenidos después del tratamiento a 50°C (figura 3.1 a y b), se observó que los genotipos Maradol y silvestre presentaban un daño morfológico de sus hojas y tallos, que incluía pérdida de turgencia y quemadura de hojas. Sin embargo, este daño fenotípico fue más evidente en el genotipo Maradol en relación con el genotipo silvestre. Así mismo, después de 168h de recuperación y riego constante se evidenció que las hojas de Maradol presentaban pérdida de clorofila con poca recuperación de turgencia, mientras que, en el genotipo silvestre éstas mantenían el color verde y mayor turgencia de hojas. En plantas con flores, temperaturas entre 40°C a 65°C se consideran causales de muerte (Binelli & Mascarenhas, 1990). Por su

parte, dentro del grupo de investigación, Bautista (2020) observó características similares después de 2h a 50°C que fueron: enrollamiento de hojas y pérdida de turgencia con un menor efecto en el genotipo silvestre. Durante la etapa de recuperación observó crecimiento de nuevos brotes y recuperación de turgencia para ambos genotipos. Así mismo, Alcocer (2013), quien trabajó con el genotipo Maradol, observó que plantas perdían turgencia después de 4h a 50°C. Al cabo de una semana de recuperación las hojas presentaron pérdida de coloración y abscisión. En ese mismo ensayo, observó que plantas expuestas 8h a 50°C presentaron pérdida de turgencia y quemadura de hojas, después de 2 semanas de recuperación las plantas no presentaron signos de mejoría, las hojas y peciolo se deshidrataron y observó pudrición de la raíz principal y ausencia de raíces secundarias. Estos resultados respaldan las observaciones fenotípicas realizadas en este trabajo de tesis, donde el incremento de temperatura provocó daños a nivel molecular que se manifestaron a nivel fenotípico.

Por otro lado, la temperatura media anual de crecimiento para *Carica papaya* es de 25°C, con extremos desde 21°C a 33°C, por lo que su rendimiento se ve afectado fuera de estos rangos (CONABIO, 2008). Sin embargo, uno de los 3 centros de origen de esta especie es la región del sureste de México (Fuentes & Santamaría, 2014), que incluye el estado de Yucatán, donde el 85.5% de su superficie posee clima cálido subhúmedo y el 14.5% restante presenta clima seco y semiseco. Adicionalmente, en lo que va del año 2023, en el mes de marzo, se registró temperaturas sobre los 34°C (Servicio Meteorológico Nacional, 2023).

Por lo tanto, si bien es cierto que los dos genotipos presentaron estrés por alta temperatura, es necesario mencionar que, las plantas jóvenes de silvestre mostraron mejor resistencia, al menos fenotípicamente, que las plantas jóvenes de Maradol. Esto podría relacionarse a las ventajas evolutivas de *C. papaya* silvestre, que, al no ser domesticada, puede crecer en condiciones climáticas adversas, como lo es la alta temperatura en el estado de Yucatán.

En la fotosíntesis, las reacciones dependientes de la luz que tienen lugar en el tilacoide, así como, el metabolismo del carbono son los principales centros de daño cuando existe estrés por altas temperaturas. El fotosistema II (PSII) es extremadamente sensible a la temperatura, disminuyendo parcialmente o cesando por completo su actividad ante el incremento de temperatura. Cuando existen temperaturas altas, las proteínas D1 y D2 pueden sufrir desnaturalización (Yadav et al., 2020).

Valores de $F_v/F_m < 0.75$ se asocian con daño sustancial al PSII (Nankishore & Farrell., 2016). Los resultados de este estudio mostraron que ambos genotipos presentaron daño en su PSII, sin

embargo, el daño fue significativamente mayor en el genotipo Maradol en comparación con silvestre. Resultados similares fueron reportados por Filaček (2022), en diferentes genotipos de trigo (*Triticum* sp. L.) expuestos a estrés por calor (45°C por 12h). En todos los genotipos evidenciaron una disminución de Fv/Fm a lo que atribuyen: cambios estructurales del PSII que impiden la transferencia de energía del complejo captador de luz al centro de reacción del PSII, inactivación del complejo generador de oxígeno, separación de antenas periféricas de los centros de reacción del PSII o la inhibición de la cadena de transporte de electrones (Filaček et al., 2022). De acuerdo con lo observado por Bautista (2020), la relación de Fv/Fm para el genotipo Maradol y silvestre después de 2h a 50°C fue de 0.6 y 0.8, respectivamente. Los valores regresan a niveles control al finalizar la etapa de recuperación para ambos genotipos. Por su parte, Alcocer (2013) observó que, con el incremento de temperatura el valor de Fv/Fm disminuye a 0.7 en el genotipo Maradol después de 2h a 50°C. Adicionalmente, al incrementar el tiempo de estrés a 4h y 8h el valor de Fv/Fm disminuye a 0.6 y 0.0 respectivamente. La tendencia de mayor resistencia del genotipo silvestre se ha evidenciado en trabajos previos dentro del grupo de investigación.

La medición de fluorescencia de la clorofila junto con las curvas de inducción de fluorescencia (JIP-test) es uno de los métodos más rápidos para detección de genotipos con mayor tolerancia a estrés abiótico y biótico. La reducción de la plastoquinona Q_A a Q_B provoca un aumento desde el paso O al J, que está asociado con las reacciones fotoquímicas primarias del PSII. Adicionalmente, los centros de plastoquinona que disminuyen rápida y lentamente se indican en las fases ascendentes J-I e I-P (Filaček et al., 2022).

A partir de las curvas OJIP obtenidas, fue evidente que existe una disminución de la amplitud de la señal de fluorescencia después del tratamiento por calor. Sin embargo, el genotipo Maradol mostró una sensibilidad diferencialmente más fuerte que el genotipo silvestre, el cual indicó un comportamiento más termoestable. De igual forma, según lo obtenido para el índice de rendimiento PI_{abs} , 2 horas son suficientes para afectar la cadena de electrones del PSII en Maradol, sin lograr que este se recupere, mientras que, según los resultados obtenidos en silvestre, los efectos inducidos por alta temperatura pueden ser reversibles, con mejor recuperación que su variedad comercial. Este comportamiento también se evidenció después de 168h de recuperación del tratamiento con calor, donde el genotipo silvestre presentó mayores puntos de inflexión OJIP que el genotipo Maradol. Por su parte, Bautista (2020), encontró una disminución en los puntos de inflexión para ambos genotipos de *C. papaya* después de 2h a 50°C. Sin embargo, al finalizar el tiempo de recuperación, el genotipo silvestre presentó un patrón

de recuperación más alto que el genotipo Maradol. Estos resultados sustentan lo observado en este trabajo, debido a que, el genotipo silvestre percibe menor daño en su cadena de transferencia de electrones a diferencia del genotipo Maradol.

Regular la conductancia estomática en las hojas resulta vital para prevenir la desecación en toda la planta, lo que, a su vez, se relaciona con adquirir CO₂ para la fotosíntesis. Cuando existe estrés por sequía los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua (Girón-Ramírez et al., 2021). Ante altas temperaturas, estos pueden permanecer abiertos para permitir el enfriamiento evaporativo de las hojas y mantener el dosel más fresco (Feller & Vaseva., 2014; Bheemanahalli et al., 2022). En un estudio realizado por Nankishore y Farrell (2016) en tres genotipos de tomate (*S. lycopersicum* L.) el grupo con tratamiento de calor (25-42°C, con riego al 100% por 15 días) presentó la mayor conductancia estomática ($g_s > 1500 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). De igual forma, la temperatura de las hojas era menor a la temperatura del aire, haciendo énfasis al efecto de enfriamiento por evaporación cuando las plantas no tenían restricción de agua. Sin embargo, al aplicar estrés por sequía y estrés combinado (sequía más calor) este efecto fue contrarrestado por el cierre de estomas al inducir un déficit de agua. Así mismo, la temperatura de las hojas incrementó significativamente en condiciones de sequía y estrés combinado (Nankishore & Farrell., 2016). Para una hoja, casi la mitad de la entrada de calor de la luz solar se disipa por transpiración (Taiz & Zeiger 2002). En plantas con poca capacidad de disipar el calor de las hojas, estas pueden llegar a calentarse hasta 15°C por encima de la temperatura del aire, por lo que hojas con baja tasa de transpiración están sujetas a altas temperaturas (dos Santos et al., 2022).

La transpiración resulta un medio importante para la disipación de calor. El calor se disipa, debido a que las moléculas de agua liberadas a la atmósfera tienen una energía superior a la media, lo que provoca la ruptura de enlaces que mantiene las moléculas en el líquido, dejando atrás una masa de moléculas con una energía inferior a la media, que es, por lo tanto, un cuerpo de agua más frío (Taiz & Zeiger 2002). En un estudio realizado por Bheemanahalli (2022), entre 2 genotipos de maíz, B73 y Mo17 (*Z. mays* L.) encontraron que la conductancia y transpiración fue mayor en el tratamiento por calor (38°C, con riego al 100% por 15 días) en comparación con los tratamientos de estrés por sequía y combinado (calor más sequía). A pesar de no presentar diferencias significativas con los grupos control, el genotipo Mo17 transpiraba 19% más que el control, por lo que, los autores sugieren que el estrés por calor desencadena la apertura de estomas para permitir que las hojas se enfríen por medio de la transpiración. Adicionalmente, una baja transpiración en el tratamiento combinado se asoció con una temperatura en la hoja

5.7°C más alta que el grupo control. Así mismo, al evaluar su efecto en rendimiento del grano (número y peso de granos), Mo17, mostró mejor tolerancia en todos los tratamientos de estrés (Bheemanahalli et al., 2022).

La fotosíntesis y transpiración están reguladas por la conductancia estomática y se afectan mutuamente. Se sabe muy poco sobre el efecto directo de la temperatura en la conductancia estomática, varios estudios de respuesta ante elevada temperatura incluyen: apertura estomática, respuesta no significativa, cierre de estomas, respuesta máxima de conductancia a temperaturas óptimas para la fotosíntesis y respuestas aún más complejas (Urban et al., 2017). Una de las respuestas ante estos resultados puede ser debido a que, para aislar el efecto directo de la temperatura sobre la conductancia se requiere de un entorno totalmente controlado, sobre todo, con respecto al déficit de presión de vapor que, suele ser difícil de lograr (Urban et al., 2017). En un estudio realizado por Urban (2017) en álamo (*Populus deltoides x nigra*) y pino (*Pinus taeda*) con temperaturas de 20-49°C y de 0-10kPa respectivamente, encontraron que la conductancia aumentaba con el incremento de temperatura. Cuando la temperatura de la hoja incrementaba de 30 a 40°C, la conductancia incrementó 42% en álamo y 40% en pino. Con suelo húmedo, las hojas de álamo con mayor transpiración eran hasta 9°C más frías que aquellas que no transpiraban, lo que mantuvo tasas positivas de fotosíntesis. Por otro lado, el pino, con tasas bajas de transpiración presentó solo 1°C de diferencia de temperatura. Adicionalmente, los autores señalan que el efecto de enfriamiento en ambas especies fue menor cuando el suelo estaba seco (Urban et al., 2017).

Una posible respuesta ante la apertura de estomas puede explicarse por un cambio en la conductividad hidráulica del camino a los sitios de evaporación. Cuando se eleva la temperatura en el ambiente, la viscosidad del agua disminuye 20% por cada 10°C, al mismo tiempo, aumenta la conductancia del mesófilo, lo que podría mejorar el suministro de agua a los sitios de evaporación y, con esto, aumentar la turgencia de las células guarda y la apertura de estomas. Así mismo, la resistencia al vapor de agua y la transferencia de calor entre los sitios de evaporación y las células guarda también pueden regular la apertura de estomas en respuesta a la transpiración y temperatura de la hoja (Urban et al., 2017)

Diversos estudios (Nankishore & Farrell., 2016; Urban et al., 2017; dos Santos et al., 2022; Bheemanahalli et al., 2022) demuestran el incremento de conductancia y transpiración para inducir enfriamiento en hojas a medida que incrementa la temperatura del aire, siempre y cuando, el suelo permanezca bien regado. El manejo del agua llega a ser una operación crítica conforme

aumenta la temperatura. Por lo tanto, a medida que las plantas puedan transpirar libremente, podrían hacer frente a las altas temperaturas. Si el agua es un factor limitante, las hojas cerrarán sus estomas para conservar agua. Por lo que, plantas con suelos muy calientes y secos pueden alcanzar fácilmente temperaturas críticas que interrumpirán procesos metabólicos. Estos resultados permiten sustentar los obtenidos en este ensayo experimental en respuesta al genotipo silvestre y Maradol. Es necesario mencionar que las plantas, de ambos genotipos, mantenían un riego del 100% con la finalidad de evitar estrés por déficit hídrico. Por lo tanto, se puede asociar este comportamiento como una respuesta de *C. papaya* silvestre para adquirir termo tolerancia ante olas cortas de calor. Sin embargo, si este suministro llegara a agotarse, existen reportes de cierre de estomas ante estrés por sequía en *C. papaya* silvestre (Girón-Ramírez et al., 2021).

Por otra parte, el estado reducido de rubisco, limita la fotosíntesis. La enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) funciona de manera eficiente con temperaturas entre 20 y 30°C, por encima de estas condiciones la tasa fotosintética tiende a reducirse. De este modo, a medida que aumenta la temperatura en las hojas, las tasas de fotorrespiración incrementan, esto debido a que la especificidad de rubisco para CO₂ vs O₂ disminuye, lo que hace más probable que ocurra una reacción de oxigenación. Adicionalmente, la solubilidad del O₂ es menor a la solubilidad de CO₂ en condiciones de alta temperatura, por lo que, existe mayor disponibilidad de O₂ para reaccionar con rubisco en condiciones cálidas, limitando el aumento de la velocidad neta de la fotosíntesis (Yadav et al., 2020). A pesar no encontrar diferencias entre el CO₂ intercelular (C_i), el aumento de C_i después del tratamiento de calor (50°C) podría explicarse por la afinidad de rubisco hacia O₂ cuando incrementa la temperatura.

Adicionalmente, la pérdida de electrolitos, causada principalmente por la salida de K⁺ de las células, así como de: Cl⁻, HPO₄²⁻, NO₃⁻, citrato³⁻, malato²⁻ que se mueven para equilibrar la salida de iones K con carga positiva, es un sello distintivo de la respuesta de las plantas ante diversos tipos de estrés y como medida de tolerancia relacionada con la estabilidad de la membrana celular (Demidchik et al., 2014). Según un estudio realizado por Wassie (2019) en diferentes cultivares de alfalfa (*M. sativa* L.) sometidos a 38°C por 7 días, encontraron que existe menor porcentaje de pérdida de electrolitos (24.07%) en el cultivar Bara310SC en comparación con el cultivar WL712 que tuvo una pérdida del 53.20% con respecto a los controles. Lo que indica que, aquellos cultivares con menor pérdida de electrolitos podrían mantener la integridad de la membrana bajo estrés térmico, indicando un comportamiento tolerante, lo cual es esencial para el rendimiento fotosintético. De igual forma, en un estudio realizado por Wang (2015) en semillas

de *Z. mays* tratadas a 45°C por 6 días, encontraron que el porcentaje de iones aumentaba conforme pasaba el tiempo de estrés por calor, especialmente a partir del tercer día de tratamiento térmico (~70%), que fue el comienzo de la muerte celular programada. Estos estudios corroboran los resultados de este trabajo de tesis, en el cual el genotipo silvestre presentó menor porcentaje de pérdida de iones en comparación con el genotipo Maradol, destacando la importancia de la tolerancia al estrés por alta temperatura en plantas. Así mismo, estos resultados contribuyen a comprender los mecanismos de respuesta de las plantas ante estrés térmico.

De igual manera, el potencial hídrico Ψ_H es una medida del estado de hidratación y disponibilidad de agua en las plantas. Una disminución en el potencial hídrico indica una menor disponibilidad de agua o una mayor dificultad para el movimiento de agua en los tejidos de la planta. En este caso, los resultados sugieren que el genotipo Maradol experimentó una mayor alteración en el movimiento de agua y una mayor disminución en su potencial hídrico después de la exposición a 50°C, en comparación con el genotipo silvestre. Con lo mencionado anteriormente, se podría explicar que silvestre es capaz de mantener la temperatura de sus hojas y Ψ_H estable mientras el suelo permanezca con riego al 100% y el agua no sea un factor limitante.

Por otra parte, la acumulación de prolina bajo estrés por alta temperatura y sequía ha sido reportada por diferentes autores (Rivero et al., 2014; Tonhati et al., 2020; Kishor et al., 2022;). La prolina, es un osmolito que puede estabilizar y proteger la estructura de las proteínas, así como, actuar como antioxidante no enzimático, capaz de eliminar OH^\cdot . Su carácter *zwitterion* o ión dipolar hace que pueda acumularse en el citoplasma de las células sin interferir con la estructura o metabolismo celular (Sattar et al., 2020). En el presente estudio, se observó que los dos genotipos acumulaban prolina después del tratamiento con temperatura y durante su recuperación. Por lo tanto, esto puede deberse a sus características osmoprotectoras, así como, chaperona para mantener la estabilidad de la membrana celular.

Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para comprender la respuesta entre diferentes genotipos de la misma especie de planta a condiciones ambientales adversas que pueden ser útiles para el desarrollo de estrategias de manejo y mejoramiento de cultivos más resistentes al estrés térmico.

3.5 CONCLUSIONES

Ante estrés por incremento de temperatura los genotipos Maradol y silvestre presentaron disminución en la eficiencia fotosintética (F_v/F_m). Sin embargo, el cultivar Maradol presentó una disminución del 9.75% más que el genotipo silvestre. Al finalizar la etapa de recuperación silvestre se recuperó al 100% mientras que Maradol al 90%. Así mismo, si bien los dos genotipos disminuyen el índice de rendimiento PI_{abs} , silvestre se recuperó un 52.10% más que Maradol.

El genotipo Maradol presentó una disminución 38.68% más que el genotipo silvestre en su actividad fotosintética. Adicionalmente, el genotipo silvestre, mostró ser más tolerante al recuperarse 36.28% más que el cultivar Maradol, lo que respalda la mayor tolerancia este genotipo en comparación con su cultivar comercial.

El genotipo silvestre presentó 175.86% y 62.75% más en valores de conductancia y transpiración, respectivamente, en comparación con el genotipo Maradol. Lo que está asociado con el enfriamiento de las hojas que puede ayudarlo a sobrevivir olas de calor cortas cuando existe suficiente agua en el suelo. Por lo que, podría relacionarse con una mayor tolerancia de este genotipo al estrés térmico a diferencia de la variedad comercial.

El movimiento y disponibilidad de agua, medido como potencial hídrico Ψ_H , se mantuvo similar al grupo control en el genotipo silvestre en comparación con el genotipo Maradol, que experimentó una mayor alteración y disminución en el movimiento de agua y potencial hídrico, durante el tratamiento con temperatura. Esta diferencia entre genotipos puede estar relacionada con las respuestas fisiológicas y morfológicas, previamente descritas, específicas de cada genotipo ante el estrés térmico.

De igual forma, se encontró que la estabilidad de la membrana, medido como porcentaje de fuga de iones fue menor en el genotipo silvestre (29.85%) en comparación con el genotipo Maradol (44.43%) durante el tratamiento con alta temperatura. Esta diferencia sugiere que el genotipo silvestre podría presentar mayor tolerancia ante estrés térmico. Una mayor estabilidad de la membrana es un indicador de una menor disrupción de la membrana celular y una mejor capacidad de mantener su integridad en condiciones de estrés.

Ante los resultados obtenidos, es importante señalar que no existe una respuesta del porqué estos genotipos responden de manera diferente, por lo que existen varios mecanismos posibles detrás de estas respuestas fisiológicas. Es posible que, debido a la falta de domesticación del genotipo silvestre, este pueda presentar rasgos de tolerancia ante alta temperatura que cultivares

comerciales han perdido. Uno de ellos es el aumento de la estabilidad de proteínas de membrana y de aquellas involucradas en la fotosíntesis (D_1 y D_2). Por lo tanto, este capítulo abre un margen para análisis bioquímicos y moleculares que permitan explicar las diferencias en el grado de termo tolerancia observados entre los genotipos.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES HSP EN *C. papaya* cv Maradol y Silvestre ANTE ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA

4.1 INTRODUCCIÓN

El panel intergubernamental de cambio climático estima un aumento de 0.3°C por década, lo que, compromete la seguridad alimentaria. Es por esto por lo que, los fitomejoradores, intentan entender cómo las especies silvestres han sido capaces de sobrevivir y adaptarse a condiciones ambientales hostiles al mejorar sus mecanismos moleculares existentes para proteger las macromoléculas termolábiles durante estrés por altas temperaturas (Guihur et al., 2022).

El estrés por alta temperatura reduce el crecimiento y productividad de los cultivos, lo que, eventualmente, conducirá a la muerte de las plantas (Jespersen., 2020). La respuesta ante el choque térmico, HSR (de sus siglas en inglés Heat Shock Response) involucra una serie de señales moleculares, incluyendo la transcripción y traducción de HSP, cuya acumulación se ha asociado con la capacidad que tienen las plantas para sobrevivir a temperaturas altas no letales (Bourgine & Guihur 2021).

Las plantas han desarrollado mecanismos eficientes para sentir la temperatura a través de sensores ubicados en la membrana plasmática, núcleo, retículo endoplasmático, mitocondrias y cloroplastos. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el sensor de calor primario se ubica en la membrana plasmática (Bourgine & Guihur 2021). En *P. patens* la acumulación de Ca^{2+} ocurre dentro de los primeros 10 minutos a 38°C (Saidi et al., 2009). Efectos similares se han reportado para distintas especies, como: tabaco, maíz y arroz (Bourgine & Guihur 2021). La membrana plasmática contiene canales catiónicos CNGCs, que modulan la entrada de iones como, Ca^{2+} . Estos canales se ensamblan como complejos homotetraméricos o heterotetraméricos, formando una gran variedad de sensores que pueden responder a diferentes intensidades de señales ambientales (Bourgine & Guihur 2021). Por su parte, los HSFs (Heat stress transcription factors) son responsables de la regulación en la expresión de genes de respuesta a calor. Sin embargo, puede existir más de una vía como: metilación del ADN o splicing alternativo que alterará la respuesta de la planta en condiciones futuras de estrés (Jespersen., 2020). Asimismo, la acumulación de hormonas, osmoprotectores, y especies reactivas de oxígeno (ROS) se han asociado con la capacidad que tiene una planta para adquirir termotolerancia (Jespersen., 2020). A pesar de los estudios antes mencionados muy poco se sabe sobre la interacción que existe entre las vías de señalización ante un estímulo por estrés abiótico. Existe variaciones considerables en la expresión de HSP entre especies, incluso entre

genotipos dentro de las especies (Bita & Gerats, 2013). Por lo que, en el presente capítulo se evaluaron los perfiles de expresión semicuantitativa (RT-PCR) y cuantitativa (qRT-PCR) de algunas *Cphsp* seleccionadas en el genotipo comercial y silvestre de *C. papaya*, bajo condiciones de temperatura control ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) vs estrés por alta temperatura (2h a 50°C) y durante el periodo de recuperación 2h a 50°C + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Extracción de ácidos nucleicos, ARN

La extracción de ARN de hoja y raíz se realizó a partir de muestras vegetales (Maradol y silvestre) recolectadas durante el ensayo de estrés térmico de este trabajo de tesis (apartado 3.2.2). Los tratamientos utilizados fueron: tiempo 0h o control ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h a 50°C y tiempo de recuperación 2h a 50°C + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). El ARN total de las muestras se aisló mediante el buffer de extracción CTAB, a partir del protocolo previamente establecido en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular de la Unidad de Biotecnología. Para ello se utilizó un peso aproximado de 100 mg de peso fresco de hoja y 200 mg de peso fresco de raíz molidos con nitrógeno líquido.

El tratamiento con ADNasa se realizó con el kit de invitrogen TURBO DNA-free™ para la digestión completa de ADN residual que pueda generar un falso positivo durante la RT-PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, la cuantificación y calidad del ARN de las muestras se verificó utilizando el equipo Nanodrop™ OneC (Thermo Scientific) con longitud de onda de 260nm y relación de pureza A_{260}/A_{280} . La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% con SYBR® Safe y condiciones de corrida; 90V, 30min y 400mA. El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.2.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 500ng de ARN tratado con ADNasa. La reacción se llevó a cabo utilizando SuperScript™III Reverse Transcriptase. Para un volumen final de 20μL por muestra, la primera reacción con 9μL de RNA, 1μL de dNTPs (10mM) y 1μL de random primers se incubó a 65°C por 5 min. Finalmente, al tubo, se le agregó 2μL de 5X First-Strand Buffer, 4μL de MgCl_2 (25mM), 2μL de DTT y 1μL de SuperScript™III RT (200 unidades/μL) bajo las siguientes condiciones de síntesis: $25^\circ\text{C}/5\text{min}$, $50^\circ\text{C}/60\text{min}$ y $70^\circ\text{C}/15\text{min}$. El ADNc se almacenó a -20°C .

4.2.3 Reacción de PCR

Los oligonucleótidos diseñados para el análisis de expresión de los genes que codifican para las CpHSP seleccionados se pueden ver en el apartado 2.2.6 del capítulo II de este trabajo de tesis. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó la enzima ADN polimerasa Taq, recombinante (5U/ μ L), para un volumen final de 50 μ L por muestra, la misma se armó con; 5 μ L de Buffer 10x PCR, 2 μ L de MgCl₂ (50mM), 0.8 μ L de dNTPs (10mM), 0.2 μ L de enzima, 1 μ L primer forward, 1 μ L primer reverse, 38.5 μ L de H₂O libre de ADNasa, y 1.5 μ L de ADNc bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de pre-desnaturalización 95°C/3min, 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión (95°C/30s, 62°C/30s y 72°C/1min respectivamente) y 1 ciclo de extensión final a 72°C/5min. La temperatura de alineamiento dependía de cada juego de oligonucleótidos utilizados.

La visualización del producto de PCR se realizó a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% con SYBR® Safe y condiciones de corrida; 70V, 70min y 400mA. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100pb (Invitrogen™).

4.2.4 Curva estándar y curva melt de amplificación para qRT-PCR

La eficiencia de reacción para los oligonucleótidos de *CpHsp17.8-2* y *Cphsp90-4* se validó mediante una curva estándar con 5 puntos y 3 repeticiones internas. La síntesis de ADNc se realizó a partir de 300ng de ARN tratado con ADNasa. Cada reacción de PCR con un volumen final de 20 μ L contenía; 0.5 μ L de primer forward, 0.5 μ L de primer reverse, 7 μ L de H₂O, 9 μ L de SYBR Green y 3 μ L de ADNc. Finalmente, las condiciones de termociclado a través del software StepOne™ v2.3 fueron; 1 ciclo de pre-desnaturalización 95°C/10min, 40 ciclos de desnaturalización y alineamiento (95°C/15s, 62°C/1min) y 1 ciclo de extensión final a 95°C/15s y 59°C/1min.

4.2.4 Cuantificación de la expresión de *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4* mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La cuantificación de la expresión de *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4* de Maradol y silvestre se realizó utilizando como gen de referencia *CpEF1a*. Los tratamientos utilizados para su análisis fueron: tiempo 0h (28 \pm 2°C), tiempo de exposición 2h (50°C) y tiempo de recuperación 168h (28 \pm 2°C). Cada reacción de qPCR contenía: 0.5 μ L de primer forward, 0.5 μ L de primer reverse, 7 μ L de H₂O, 9 μ L de SYBR Green y 3 μ L de ADNc, bajo las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo de pre-desnaturalización 95°C/10min, 40 ciclos de desnaturalización y alineamiento (95°C/15s, 62°C/1min)

4.2.5 Evaluación estadística

El análisis estadístico para determinar diferencias en la expresión por qRT-PCR de *Cphsp17.8-2* entre *C. papaya* cv Maradol y silvestre se realizó a través del software R con el paquete R commander. La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilk. De acuerdo con la distribución normal de los datos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA $p < 0.05$) o un Modelo Lineal Generalizado (GLM $p < 0.05$) para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Como prueba de comparación de medias se empleó la prueba de Duncan. De esta forma, la hipótesis alternativa planteada fue que, existían diferencias significativas entre la expresión del gen, tratamientos y entre genotipos: tiempo 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (50°C), postratamiento o recuperación 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), o que, por el contrario, las medias de los tratamientos no presentaban diferencias, considerada como la hipótesis nula.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análisis de integridad y pureza de ARN

La concentración de ARN (ng/ μL) correspondiente a hoja y raíz de *C. papaya* cv Maradol y silvestre para cada uno de los tratamientos se detalla en la tabla 4.1, así como su relación de pureza 260/280 y 260/230, mismos que para ARN debe ser de 2 y de 2.0-2.4 respectivamente.

Tabla 4.1. Cuantificación de ARN (ng/ μL) y relación de pureza A260/280 y A260/230 de hoja y raíz de *C. papaya* cv Maradol y silvestre en diferentes tratamientos.

Genotipo	Tejido	Tratamiento	ng/ μL	260/280	260/230	Rendimiento
Maradol	Hoja	0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	1102.4	1.96	2.35	8.82
	Hoja	2h (50°C)	865.9	1.99	2.36	7.40
	Hoja	2h(50°C) +168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	714.0	1.98	2.33	5.49
	Raíz	0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	449.9	1.96	2.00	2.14
	Raíz	2h (50°C)	218.5	1.98	2.16	1.08
	Raíz	2h(50°C)+168h($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	232.8	1.99	1.96	0.59
Silvestre	Hoja	0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	861.8	1.99	2.37	6.63
	Hoja	2h (50°C)	1021.9	1.96	2.38	6.05
	Hoja	2h(50°C) +168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	1099.2	1.97	2.36	7.58
	Raíz	0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	548.6	2.02	2.32	2.47
	Raíz	2h (50°C)	287.9	1.92	2.22	1.38
	Raíz	2h(50°C)+168h($28 \pm 2^\circ\text{C}$)	125.8	1.77	2.13	1.07

Por su parte, la integridad de ARN de cada muestra se ilustra en la figura 4.1. Se observaron 2 bandas correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 28S y 18S. No se observaron trazas de ADN genómico después del tratamiento con ADNasa.

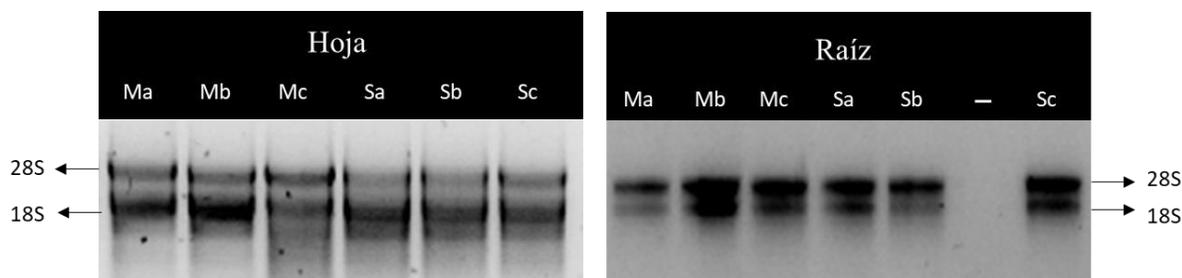


Figura 4.1. Subunidades de ARN ribosomal correspondientes a *C. papaya* cv Maradol y silvestre para cada tratamiento. Gel de agarosa 1.5%, teñido con SYBR Safe. Ma, Maradol control 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); Mb, Maradol tiempo de exposición 2h (50°C); Mc, Maradol recuperación 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); Sa, silvestre control 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); Sb, silvestre tiempo de exposición 2h (50°C); Sc, silvestre recuperación 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.3.2 Expresión de genes *Cphsp17.8-2* y *Cphsp17.8-3* en plantas jóvenes de *C. papaya* cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura

A partir del análisis bioinformático realizado previamente en este trabajo de tesis (Capítulo II, sección 2.3.1 y 2.3.3) se seleccionaron 2 genes que codifican para la proteína CpHSP17.8, *Cphsp17.8-2* y *Cphsp17.8-3*, reportados como inducibles por alta temperatura en otras especies vegetales (Li et al., 2016, Jiang et al., 2019; Sewelam et al., 2019).

El efecto de estrés por alta temperatura (2h/ 50°C) en *C. papaya* Maradol y silvestre en hoja como en raíz se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. Los resultados indicaron que, la expresión de *Cphsp17.8-2* en hoja para ambos genotipos bajo condiciones control: 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) fue baja. Sin embargo, la expresión del gen se induce después del tratamiento con temperatura: 2h (50°C) para Maradol así como, para silvestre. Adicionalmente, si bien, la expresión de *Cphsp17.8-2* baja en condiciones de recuperación: 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) en ambos genotipos, se observa una mayor intensidad de banda en el genotipo silvestre a diferencia del genotipo Maradol (figura 4.2 A.1). Así mismo, en las muestras control de raíz, se observa mayor expresión de *Cphsp17.8-2* en el genotipo Maradol que en el genotipo silvestre. Al igual que en hoja, su expresión se ve inducida por alta temperatura para ambos genotipos manteniéndose hasta el tiempo de recuperación. La acumulación de *Cphsp17.8-2* fue mayor en el tiempo de recuperación de raíz a diferencia de hoja para ambos genotipos (figura 4.2 B.1).

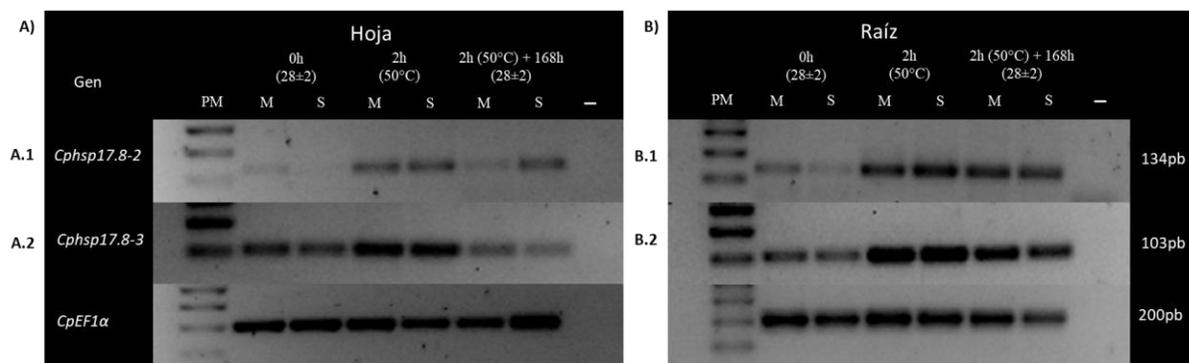


Figura 4.2. Expresión semicuantitativa de: *Cphsp17.8-2* y *Cphsp17.8-3* en *C.papaya* cv Maradol y silvestre bajo 3 tratamientos: control, 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); tiempo de exposición, 2h (50°C); recuperación, 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) en A) hoja y B) raíz. El gel *CpEF1α* se utilizó como gen de referencia. Gel de agarosa 2%, teñido con SYBR Safe. M, Maradol; S, silvestre; PM, peso molecular 100pb; -, control negativo.

Por otro lado, se observó que *Cphsp17.8-3* se expresa en hoja bajo condiciones control, 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), para ambos genotipos. Sin embargo, al igual que su isoforma *Cphsp17.8-2*, *Cphsp17.8-3* se sobre expresa ante estrés por incremento de temperatura. Esta inducción se ve reducida cuando las plantas regresan a condiciones normales en *C. papaya* cv Maradol y silvestre (figura 4.2 A.2). Así mismo, en raíz, la sobre expresión de *Cphsp17.8-3* se induce ante alta temperatura para ambos genotipos. Sin embargo, a diferencia de la hoja, la acumulación de transcritos se mantiene hasta la etapa de recuperación. Si bien, se observa menor expresión que en la etapa de estrés, 2h (50°C), esta es mayor que su expresión en condiciones normales (figura 4.2 B.2).

4.3.2 Expresión de genes *Cphsp70-1*, *Cphsp70-6*, *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8* en plantas de *C. papaya* cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura

Para perfilar el patrón de expresión de los genes que codifican para las proteínas HSP70 citosólicas y su posible rol ante estrés por alta temperatura se evaluó su expresión semicuantitativa en hoja y raíz de *C. papaya* cv Maradol y silvestre. En este trabajo de tesis se encontraron 10 genes que codifican para CpHSP70, de los cuales se escogieron 4 posibles genes de respuesta: *Cphsp70-1*, *Cphsp70-1*, *Cphsp70-1* y *Cphsp70-1* ante incremento de temperatura (apartado 2.3.1 y 2.3.3).

Los resultados indicaron que, la expresión de *Cphsp70-1* y *Cphsp70-6* en hoja, como en raíz, se mantiene similar en condiciones normales: 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) así como, durante estrés por alta temperatura: 2h (50°C) y en la etapa de recuperación de las plantas 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) para ambos genotipos (figura 4.3 A.1-A.2, B.1-B.2).

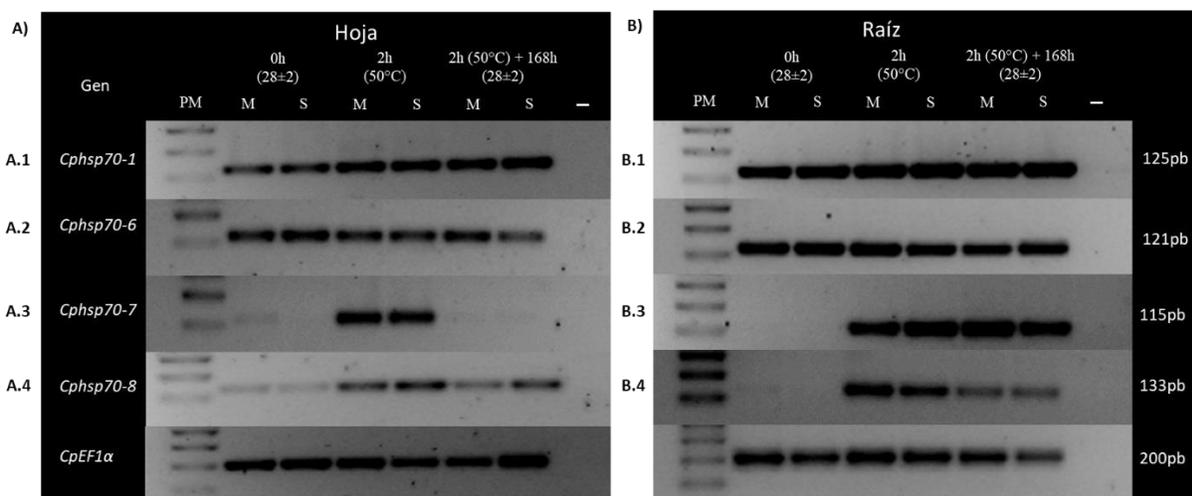


Figura 4.3. Expresión semicuantitativa de *Cphsp70-1*, *Cphsp70-6*, *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8* en *C.papaya* cv Maradol y silvestre bajo 3 tratamientos: control, 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); tiempo de exposición, 2h (50°C); recuperación, 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) en A) hoja y B) raíz. El gel *CpEF1α* se utilizó como gen de referencia. Gel de agarosa 2%, teñido con SYBR Safe. M, Maradol; S, silvestre; PM, peso molecular 100pb; -, control negativo.

Por otro lado, se observó que la expresión de *Cphsp70-7* es inducible solamente cuando existe estrés por alta temperatura: 2h (50°C) con baja o casi nula expresión en condiciones control o de recuperación para Maradol y silvestre (figura 4.3 A.3). En raíz, no existe expresión de *Cphsp70-7* en ausencia de estrés. Sin embargo, su expresión se induce para ambos genotipos después de 2h de estrés a 50°C (figura 4.3 B.3) y se mantiene hasta la etapa de recuperación, siendo diferente a lo observado en hoja. Así mismo, los resultados indicaron baja expresión de *Cphsp70-8* en hoja bajo condiciones control de temperatura para *C. papaya* Maradol y silvestre, mientras que, al finalizar el tiempo de estrés por alta temperatura se observó un incremento en el nivel de expresión para ambos genotipos. Durante el periodo de recuperación se observó que existe mayor acumulación de transcritos *Cphsp70-8* en el genotipo silvestre, a diferencia del genotipo Maradol (figura 4.3 A.4). Por su parte, en raíz, no existe expresión de *Cphsp70-8* en las muestras control de ambos genotipos. No obstante, la mayor expresión de este gen se observó después del periodo de estrés, indicando mayor acumulación de transcritos en este tejido a diferencia de hoja, para Maradol, así como, silvestre. La expresión de *Cphsp70-8* se reduce durante la etapa de recuperación de las plantas. Sin embargo, su expresión es mayor a los niveles observados en condiciones control para ambos genotipos (figura 4.3 B.4).

4.3.2 Expresión de genes *Cphsp90-1* y *Cphsp90-4* en plantas de *C. papaya* cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura

A partir de los resultados obtenidos en el análisis bioinformático (apartado 2.3.3) se eligieron 2 posibles genes *Cphsp90* (*Cphsp90-1* y *Cphsp90-4*) cuyo patrón de expresión pudiera estar involucrado en la tolerancia del genotipo silvestre ante incremento de temperatura. Los resultados indicaron que, la expresión de *Cphsp90-1* en el genotipo Maradol no varía entre condiciones control, estrés o recuperación. Sin embargo, en el genotipo silvestre, se observó un incremento en la expresión de este gen después de 2h a 50°C que se mantuvo hasta la etapa de recuperación, aunque con menor expresión (figura 4.4 A.1). Por otro lado, la expresión semicuantitativa de *Cphsp90-1* en raíz se mantuvo igual entre tratamientos y genotipos, sobre todo en la etapa de estrés por alta temperatura (figura 4.4 B.1).

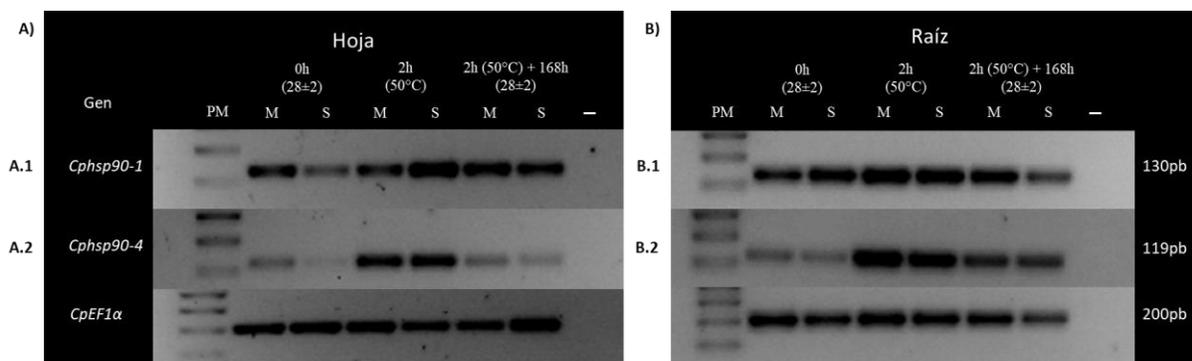


Figura 4.4. Expresión semicuantitativa de *Cphsp90-1*, y *Cphsp90-4* en *C.papaya* cv Maradol y silvestre bajo 3 tratamientos: control, 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); tiempo de exposición, 2h (50°C); recuperación, 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) en A) hoja y B) raíz. El gel *CpEF1 α* se utilizó como gen de referencia. Gel de agarosa 2%, teñido con SYBR Safe. M, Maradol; S, silvestre; PM, peso molecular 100pb; -, control negativo.

Por su parte, en condiciones control de crecimiento, *Cphsp90-4* indicó un nivel de expresión bajo para el genotipo Maradol y casi inexistente para el genotipo silvestre en hoja. Sin embargo, es fuertemente inducido ante estrés por calor en ambos genotipos. La expresión se reduce nuevamente cuando las plantas regresan a temperatura ambiente en la etapa de recuperación (figura 4.4 A.2). Se observó un patrón similar en raíz, los niveles de transcritos de *Cphsp90-4* en muestras control se mantienen bajos para ambos genotipos, pero se incrementan rápidamente en respuesta a alta temperatura, 2h (50°C). En la etapa de recuperación se observó menor expresión del gen para Maradol y silvestre en comparación con el tratamiento de estrés. No obstante, la expresión es mayor a la observada en condiciones control (figura 4.4 B.2). Es preciso mencionar que, el nivel de *Cphsp90-4* en la etapa de recuperación es mayor en raíz que en hoja, patrón que se observó también para los genes *Cphsp17.8-2*, *Cphsp17.8-3* y *Cphsp70-7*.

4.3.3 Validación de oligonucleótidos *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4* en *C. papaya* cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura

Para llevar a cabo un análisis cuantitativo, el análisis de la curva estándar y curva melt para *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4* se realizó con la finalidad de determinar la especificidad de los oligonucleótidos en distintas concentraciones de ADNc durante el ensayo de qRT-PCR. Los resultados mostraron una eficiencia de reacción de 88.85%, regresión lineal, R^2 , de 0.999 y pendiente de -3.622 para *Cphsp17.8-2* y una eficiencia de 92.43% con regresión línea, R^2 , de 0.996 y pendiente de -3.518 para *Cphsp90-4* (figura 4.5 A y C). Por lo general, se considera una eficiencia de reacción aceptable entre 80%-110% y pendiente ≥ -3.6 . Una eficiencia del 100% significa que la cantidad de producto de la reacción se está duplicando en cada ciclo. De acuerdo con la metodología detallada previamente, cada muestra se corrió por triplicado con control negativo, utilizando H_2O libre de ADNasa.

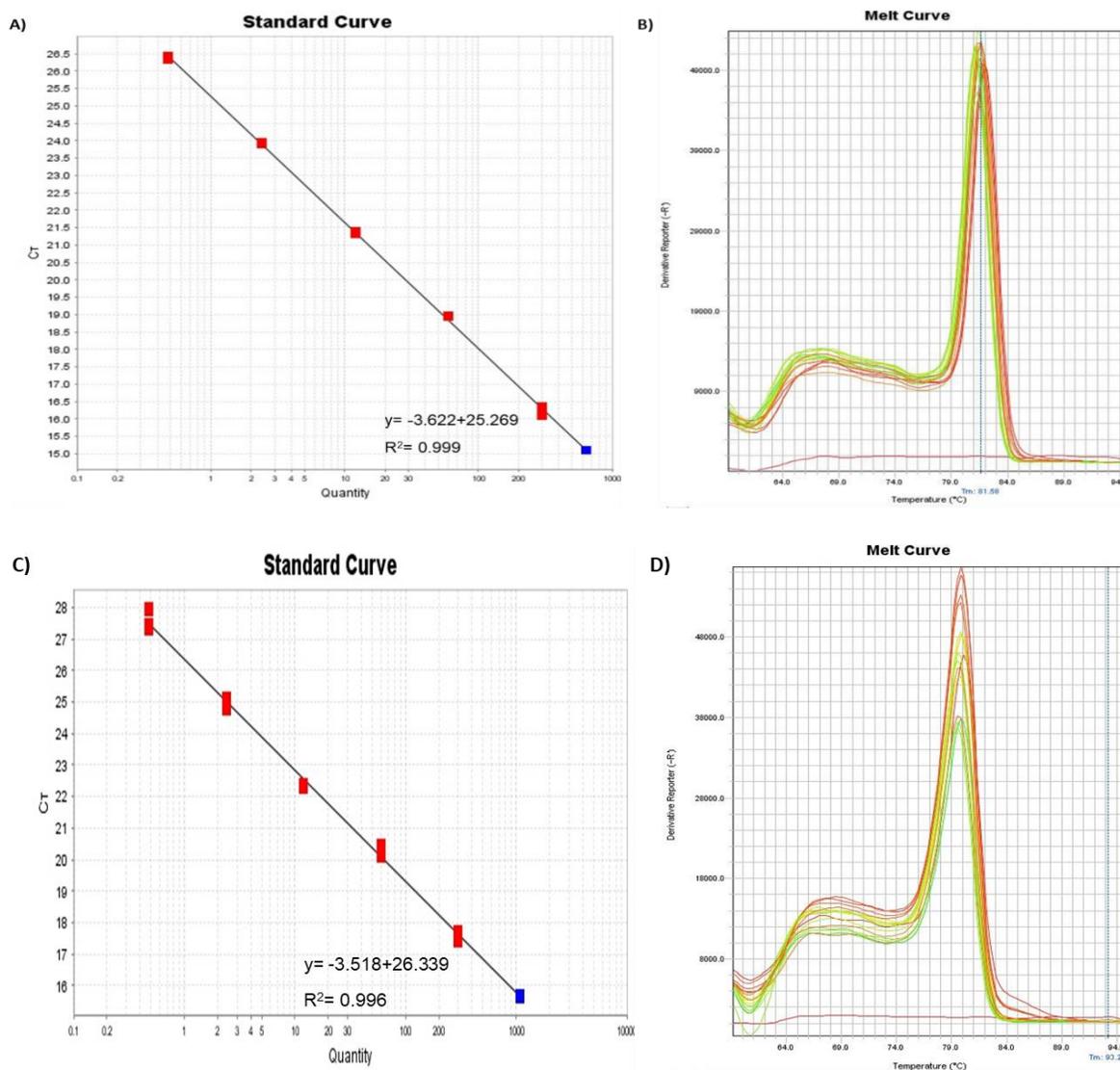


Figura 4.5. A) Curva estándar para *Cphsp17.8-2* a partir de 300ng de ARN. Los valores de Ct para cada dilución hecha por triplicado se indican en la parte izquierda de la figura A, así como la ecuación de la recta y el valor de regresión lineal R^2 . B) Curva melt de *Cphsp17.8-2* con un solo pico de fluorescencia. La línea roja representa el control negativo de la reacción. C) Curva estándar para *Cphsp90-4* a partir de 300ng de ARN. Los valores de Ct para cada dilución hecha por triplicado se indican en la parte izquierda de la figura A, así como la ecuación de la recta y el valor de regresión lineal R^2 . D) Curva melt de *Cphsp90-4* con un solo pico de fluorescencia. La línea roja representa el control negativo de la reacción.

Por otro lado, los resultados de la curva melt (figura 4.5 B y D) indicaron un solo pico de fluorescencia para cada uno de los 5 puntos utilizados en la curva estándar de *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4*, lo que comprobó que existía un solo amplicon o producto de qRT-PCR. Por lo tanto, se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos, validando, de esta forma el ensayo cuantitativo qRT-PCR para los dos genes *hsp*.

4.3.4 Cuantificación del nivel de expresión relativa de *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4* en *C. papaya cv Maradol* y silvestre ante estrés por alta temperatura

Con la finalidad de analizar el posible mecanismo molecular sobre la respuesta ante incremento de temperatura mediada por *Cphsp17.8-2* y *Cphsp90-4* que se observó en el análisis semicuantitativo RT-PCR (figura 4.6 A), se cuantificó la expresión de este gen en 3 tratamientos; control o condiciones normales: 0h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de estrés: 2h (50°C) y etapa de recuperación: 2h (50°C) + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Los resultados indicaron que existe un nivel de expresión relativa (REL, relative expression level) ≤ 1 en condiciones control para ambos genotipos. Sin embargo, cuando se incrementó la temperatura, la expresión de *Cphsp17.8-2* se induce rápida y significativamente (GLM $p < 0.05$) en relación con los controles, alcanzando un REL de 5955 para el genotipo Maradol y un REL de 6295 para el genotipo silvestre. Durante la etapa de recuperación, la expresión del gen se reduce significativamente, el REL de Maradol fue de 2.43, mientras que el REL de silvestre fue de 5.43 (figura 4.6). A pesar de que la expresión de *Cphsp17.8-2* disminuyó al regresar a la temperatura normal, los niveles de expresión seguían siendo considerablemente más altos que los niveles basales o de control. La expresión de *Cphsp17.8-2* inducible por alta temperatura confirma la extrema sensibilidad de las small Heat Shock Proteins a la alta temperatura.

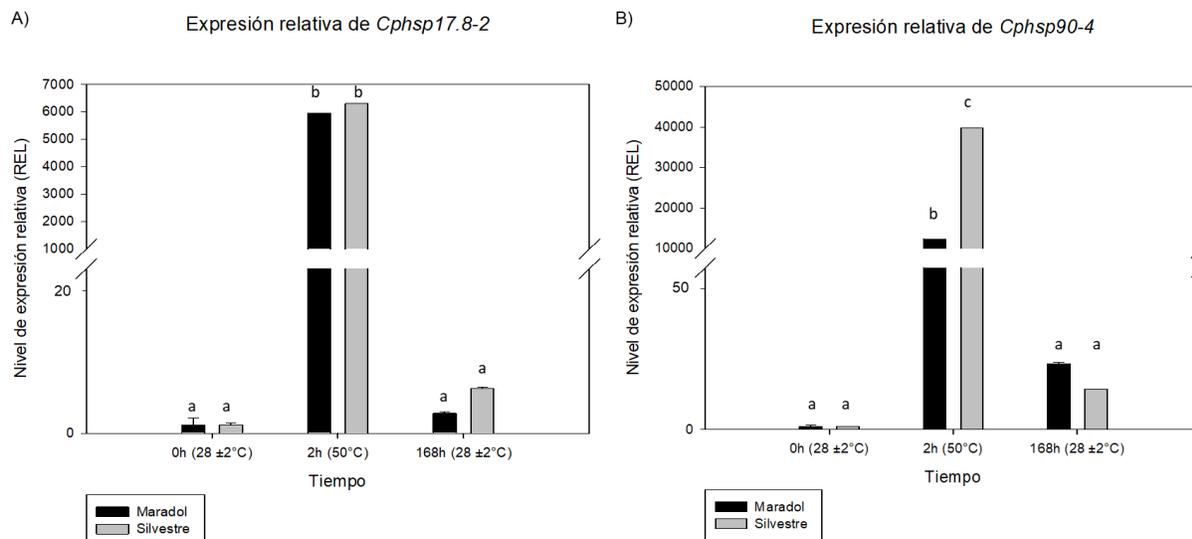


Figura 4.6. A) Nivel de expresión relativa de *Cphsp17.8-2* de *C. papaya* cv Maradol y silvestre ($p < 0.05$), B) Nivel de expresión relativa de *Cphsp90-4* bajo 3 tratamientos: control 0h (28 ± 2°C), tiempo de estrés: 2h (50°C) y etapa de recuperación: 2h (50°C) + 168h (28 ± 2°C). El gen CpEF1α se utilizó como gen de referencia y los REL fueron estimados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Por otra parte, la expresión de *Cphsp90-4* también se induce por la alta temperatura en *C. papaya* cv Maradol y silvestre. En condiciones control la expresión de *Cphsp90-4* es ≤ 1 . Sin embargo, después del tratamiento de estrés (2h a 50°C) la expresión de este gen es significativamente ($p < 0.05$) mayor en el genotipo silvestre, con un REL de 39786, mientras que Maradol presentó un REL de 12330. Durante la etapa de recuperación se observó un descenso de la expresión de *Cphsp90-4* en los dos genotipos, siendo de 12 para silvestre y de 20 para el genotipo Maradol. Al igual que *Cphsp17.8-2*, el nivel de expresión de *Cphsp90-4* en el periodo de recuperación fue considerablemente mayor que los niveles control.

Estos resultados sugieren que el gen *Cphsp90-4* desempeña un papel importante en la respuesta de la papaya al estrés por alta temperatura, y que existe una variación en la magnitud de la respuesta entre los genotipos Maradol y silvestre.

4.4 DISCUSIÓN

En años recientes, el entendimiento sobre las HSP y su papel como chaperonas moleculares se ha ampliado como resultado de análisis genómicos y transcriptómicos ante diversos tipos de estrés abiótico (Guihur et al., 2022). Adicionalmente, este tipo de análisis sugiere que la expresión de genes que codifican para HSP es regulada por factores ambientales y señales internas, lo que contribuye a la plasticidad y adaptabilidad de los organismos frente a distintas condiciones adversas (Guihur et al., 2022; Qi et al., 2022). Estas proteínas se activan como una

respuesta adaptativa ante situaciones estresantes y juegan un papel importante en la protección y preservación de la integridad celular, uniéndose a proteínas que se encuentran en conformaciones inestables evitando así, la formación de agregados (Talalaiev & Korduym., 2014; Hi et al., 2022).

Las small Heat Shock Protein, sHSP, con un peso molecular entre 12-25kDa, cumplen su rol como chaperona ATP-dependiente al facilitar el replegamiento de proteínas mal formadas y mejorar el rendimiento de las plantas para adaptarse ante estrés ambiental (Qi et al., 2022). Si bien, la mayoría de estas proteínas no están presentes en condiciones normales se ha registrado su expresión en varios tipos de estrés biótico y abiótico (Li et al., 2016; Jiang et al., 2019; Qi et al., 2022).

Los patrones de expresión de sHSP proporcionan información útil sobre las funciones de estos genes ante condiciones de estrés. En un estudio realizado en *P. trichocarpa* por Li (2016), ante incremento de temperatura observaron que, el nivel de expresión relativa de *Pthsp17.8* en hoja era >2500 después de 0.5h a 37°C. A medida que el estrés por temperatura se prolongaba (6-12h), el nivel de ARNm desciende hasta alcanzar un rango de expresión relativa entre 220-230. Así mismo, en otro estudio realizado por Jiang (2009), en *R. chinensis*, los resultados de expresión semicuantitativa de *Rchsp17.8* indicaron que el gen no estaba expresado en hoja ni raíz en ausencia de estrés. No obstante, su expresión se inducía después de 3h a 38°C. Adicionalmente, observaron una mayor acumulación de transcritos de *Rchsp17.8* después de 30min a 50°C lo que indica una respuesta de este gen más rápida y robusta a temperaturas más altas y que su expresión es sensible a la magnitud y duración de la temperatura estresante.

De igual manera, en un estudio realizado por Sewelam (2019) en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por calor, observaron que los niveles de expresión de *hsp17.4Cl* aumentaron drásticamente (~50) luego de 2h a 45°C. Además, obtuvieron niveles de expresión similares cuando el tiempo de estrés fue de 4h y 6h. Los autores señalan el bajo nivel de expresión basal de este gen en plantas con ausencia de estrés.

Estos resultados sugieren que, al igual que *Pthsp17.8*, *Rchsp17.8* y *hsp17.4Cl*, la expresión de *Cphsp17.8-2* en hoja de *C. papaya* cv Maradol y silvestre es altamente inducida en respuesta a un rápido aumento de temperatura. Sin embargo, la expresión disminuye cuando las condiciones regresan a temperatura ambiente (etapa de recuperación). Este patrón sugiere una respuesta temprana y transitoria de *Cphsp17.8-2* en ambos genotipos y es consistente con estudios previos

que indican que, en condiciones normales de crecimiento la mayoría de sHSP no se pueden detectar en tejidos vegetativos.

Por otro lado, si bien, la expresión de *Cphsp17.8-2* y *Cphsp17.8-3* en raíces se ve inducida por alta temperatura esta se reduce durante la etapa de recuperación, pero aún se mantiene por encima de los niveles control. Esto sugiere que la inducción de estos genes en las raíces es una respuesta adaptativa a la alta temperatura y que la planta es capaz de mantener cierta capacidad de respuesta y adaptación a futuros eventos de estrés por calor incluso después de que se haya reestablecido la temperatura normal.

Dentro de la familia HSP, las proteínas HSP70 son responsables del correcto ensamblaje y plegamiento de proteínas nacientes, replegamiento de proteínas agregadas y mal formadas, y translocación de la membrana. Las HSP70 interactúan con las regiones hidrofóbicas de las proteínas mal formadas, replegándolas de manera correcta. Adicionalmente, pueden actuar como proteínas de limpieza o housekeeping por su papel dentro de las funciones celulares debido a que controlan y regulan la construcción de componentes para las vías de transducción (Rehman et al., 2020).

La amplia gama de funciones de las HSP se logra a través de la interacción entre proteínas cochaperonas y chaperonas específicas, como HSP70, para ayudar al correcto plegamiento de proteínas, prevención de agregados y protección contra el estrés celular. Estos mecanismos aseguran un funcionamiento celular óptimo en condiciones normales o adversas (Rehman et al., 2020).

En un análisis genómico realizado por Guo (2016), se identificaron 21 miembros pertenecientes a la familia HSP70 en *C. annuum* L. En condiciones normales (26°C) el análisis semicuantitativo de estos genes dio como resultado que no todos los miembros de esta familia estaban expresados en los diferentes tejidos (raíz, tallo, hoja y flores). Sin embargo, la mayoría se inducía ante alta temperatura (2h/46°C) resaltando el papel de estos genes ante la protección y adaptación de las células, mejorando la termotolerancia. Cabe destacar que algunos miembros HSP70 mantuvieron su nivel de expresión a pesar del episodio de estrés, lo que comprueba también la importancia de estas proteínas en funciones esenciales bajo condiciones normales. Adicionalmente, dentro de este estudio, la variedad transgénica de *Arabidopsis* que sobre expresaba *Cahsp70-2* mostró un nivel de expresión de genes *Athsp17.6* y *Athsp25.3* 10 veces mayor que las plantas control (no transformadas) lo que sugiere que HSP70 podría interactuar

con sHSP para mitigar la agregación de proteínas termolábiles y replegar proteínas no nativas, restaurando su función biológica como una respuesta temprana ante el choque térmico.

Por otra parte, en un estudio realizado por Yin (2023), en *C. lavandulifolium*, encontraron 83 miembros pertenecientes a la familia HSP70, 10 de ellos se seleccionaron para su análisis cuantitativo por qRT-PCR según sus elementos de respuesta ubicados en las regiones promotoras de cada gen. Los autores encontraron que después de 1h a 37°C la mayoría de *Clhsp70* era inducible por incremento de temperatura con niveles de expresión >20 en hojas, la acumulación de ARNm decaía con tiempos prolongados de calor (37°C/6h). Así mismo, señalan que el aumento de expresión tiene como objetivo mejorar la capacidad de la planta para resistir el estrés y proteger las estructuras celulares. No obstante, se necesita más investigación para comprender el mecanismo involucrado en su regulación, lo que incluye investigar vías de señalización, factores de transcripción involucrados en la transcripción de genes HSP, así como, la interacción con otras proteínas y cofactores.

Por su parte, Jiang (2020), evaluó la expresión de *Rchsp70* en variedades termotolerantes y no tolerantes de *R. hybrida*. Los resultados de la expresión semicuantitativa indicaron que *Rchsp70* no estaba presente en ninguna variedad a temperatura control (25°C). Sin embargo, luego de 3h a 38°C, la expresión de *Rchsp70* fue altamente inducible en las variedades resistentes, pero no en las variedades sensibles. Lo que indica que la expresión de *Rchsp70* está directamente relacionada con la tolerancia al calor en las variedades de *R. hybrida*.

Estos resultados sustentan lo encontrado en este trabajo de tesis, 4 CpHSP70 se eligieron para evaluar su perfil de expresión bajo condiciones de estrés, 2 de ellas (*Cphsp70-1* y *Cphsp70-6*) no se inducen ante el incremento de temperatura en hoja o raíz, lo que sugiere su papel en funciones celulares normales que permiten mantener el equilibrio celular. Por otra parte, la expresión de *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8* se induce ante estrés por calor y regresa a sus valores normales de expresión cuando la temperatura se ha reestablecido. Sin embargo, en el caso de las raíces, aunque la expresión de estos genes disminuye en comparación con el pico de inducción, aún es significativamente mayor a los niveles de las muestras control sobre todo para *Cphsp70-7*. Estos resultados indican que los genes *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8* son regulados de manera diferencial en distintos tejidos de *C. papaya* cv Maradol y silvestre en respuesta al choque térmico. Mientras que, en hoja, los niveles de expresión disminuyen, en raíces se mantiene la expresión elevada, lo que sugiere que estas proteínas junto con sHSP pueden desempeñar un papel importante en la protección de proteínas termolábiles de las raíces y, por lo tanto, la adaptación de este tejido ante estrés térmico.

La identificación de mecanismos de regulación podrá brindar nuevos conocimientos sobre cómo las células responden ante estrés por calor y, de esta forma, aportar a la mejora de variedades vegetales para que sean resistentes ante condiciones ambientales adversas (Yin et al., 2023).

En eucariotas las isoformas de HSP90 representan entre 1-2% de las proteínas celulares totales, cantidad que puede aumentar del 4-6% bajo condiciones de estrés (di Donato & Geisler., 2019). HSP90 controla diversos procesos celulares a través de la maduración, estabilidad, actividad y renovación de sus sustratos de las llamadas proteínas clientes. Estas proteínas pueden tener funciones fisiológicas o moleculares que activaran una cascada de señales constitutivas o de respuesta a estrés (di Donato & Geisler., 2019).

Cuando existe situaciones de estrés, como estrés por alta temperatura, el requisito de HSP90 se incrementa significativamente. Por lo que, HSP90 puede ser reclutada por proteínas específicas comprometidas en el episodio de estrés para mantener su funcionalidad en condiciones adversas. Se ha propuesto que HSP90 puede actuar como amortiguador fenotípico al ocultar polimorfismos genéticos que podrían manifestarse en el fenotipo. Cuando HSP90 es reclutada en episodios de estrés, se libera de su función reguladora normal y deja de amortiguar ciertos polimorfismos genéticos. Esto puede llevar a la expresión fenotípica de características que estaban enmascaradas previamente por HSP90. Si tales características representan una ventaja para el organismo ante condiciones de estrés pueden ser heredadas a la siguiente generación, proporcionando una explicación molecular para el fenómeno de aparente asimilación de características adquiridas inducidas por el medio ambiente en plantas y animales. Sin embargo, la relación entre HSP90 y la variación genética fenotípica necesita más estudio para comprender los mecanismos de regulación (Cowen & Lindquist., 2005; di Donato & Geisler., 2019).

Según un estudio realizado por Xu (2013), en *G. max*, la expresión de 12 genes *Gmhsp90*, en hoja, se induce después de 30min a 42°C, misma que disminuye después de 24h a 42°C. En particular, los genes *Gmhsp90A1* y *Gmhsp90A2* se inducen de manera drástica por temperatura, alcanzado su máxima expresión entre 4000-6000 veces más después de 1h a 42°C. El nivel de transcritos disminuyó en tiempos prolongados (24h) de estrés, no obstante, los niveles son mayores en comparación con los demás genes *Gmhsp90*. Así mismo, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre expresaban *Gmhsp90* se encontró mayor contenido de prolina y expresión de *AtP5CS1*, que codifica para la enzima 1-pirrolina-5-carboxilato, responsable de la biosíntesis de prolina. Estos resultados sugirieron una correlación entre HSP90, P5CS1 y prolina en condiciones normales.

Adicionalmente, el estudio de Li (2020), en plantas de *S. tuberosum* encontró que el nivel de expresión cuantitativo de 7 genes *Sthsp90* en hojas incrementaba durante el episodio de estrés (35°C/24h) con niveles de expresión entre 10-35 veces más que las plantas control. En raíces la expresión de *Sthsp90.2* se inducía significativamente por temperatura a diferencia de los demás genes *Sthsp90*, lo que sugiere que *Sthsp90.2* puede desempeñar un papel específico en la respuesta al estrés por calor en las raíces de papa.

Adicionalmente, en el estudio realizado en *N. tabacum* por Song (2019), encontraron diferentes patrones de expresión cuantitativa en 11 genes *Nthsp90* ante estrés por calor en hojas. De esta familia, la expresión de 5 subclases de *Nthsp90* no era inducida por calor y se mantenía constitutiva a pesar del tratamiento con temperatura (42°C), lo que sugiere una regulación independiente del estrés térmico en *N. tabacum*. Sin embargo, el resto de los genes evaluados mostró perfiles de expresión únicos en respuesta al estrés por calor, respondiendo al estrés después de 3h de tratamiento a 42°C y con picos máximos de expresión a las 6h y 12h de tratamiento. Por lo que, la expresión de *Nthsp90* se ve modulada de manera temporal durante el periodo de estrés.

Estos resultados permiten sustentar lo observado en la expresión semicuantitativa de *Cphsp90-1* en donde se observó que existe mayor expresión del gen *Cphsp90-1* en hoja en el genotipo silvestre en comparación con el genotipo Maradol. Esto indica que *Cphsp90-1* podría desempeñar un papel importante en la respuesta al estrés por alta temperatura en las hojas del genotipo silvestre. No obstante, la expresión de *Cphsp90-1* en raíz se mantiene constitutiva lo que podría sugerir el papel de este gen en funciones esenciales de este tejido, independientemente de las condiciones de estrés.

De igual manera, el análisis de expresión cuantitativa de *Cphsp90-4* indicó un mayor nivel de expresión relativa de este gen en el genotipo silvestre en comparación con su cultivar Maradol, lo que puede indicar que el genotipo silvestre tiene una respuesta más robusta y eficiente para proteger las proteínas celulares durante el estrés por alta temperatura. Esto puede conferirle una mayor tolerancia al estrés y, potencialmente, una mejor capacidad para sobrevivir y recuperarse de condiciones adversas. Este patrón de expresión sugiere que *Cphsp90-4* desempeña un papel importante en la respuesta inicial al estrés por temperatura en hojas.

4.5 CONCLUSIONES

En conjunto, estos hallazgos destacan la diversidad de respuesta de los genes que codifican para CpHSP en *C. papaya* cv Maradol y silvestre. Con genes que muestran una expresión

constitutiva (*Cphsp70-1*, *Cphsp70-6* y *Cphsp90-1*) mientras que otros presentan patrones de expresión inducidos y temporales en respuesta al estrés térmico (*Cphsp17.8-2*, *Cp17.8-3*, *Cphsp70-7*, *Cphsp70-8* y *Cphsp90-4*), lo que proporciona nueva información en el contexto de la respuesta al estrés por alta temperatura en plantas de papaya.

El análisis de expresión cuantitativa indicó que existe mayor nivel de expresión relativa de *Cphsp90-4* en el genotipo silvestre en comparación con su cultivar Maradol durante estrés por alta temperatura (2h a 50°C) lo que podría estar relacionado con una mayor respuesta tolerante ante estrés térmico en papaya silvestre. Estos hallazgos abren nuevas opciones de mejoramiento genético para el desarrollo de cultivares tolerantes. Es necesario mencionar que se desconoce el patrón de expresión cuantitativo de hoja y raíz para el resto de los genes estudiados en este trabajo de tesis, lo que podría brindar más información sobre la respuesta ante incremento de temperatura en ambos genotipos.

Estos resultados son importantes para comprender la regulación de los genes *Cphsp* en respuesta al estrés por alta temperatura y su papel en la protección y adaptación de las células ante condiciones ambientales desfavorables (alta temperatura). Así mismo, permiten la selección de genes que podrían ser utilizados en el mejoramiento genético de *C. papaya* para aumentar su tolerancia al estrés térmico, como, por ejemplo: *Cphsp17.8-2*, *Cphsp70-7*, *Cphsp70-8* y *Cphsp90-4*.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL

Las plantas enfrentan diversos tipos de estrés ambiental durante su crecimiento y desarrollo, como: sequía, temperatura, salinidad y metales pesados. Sin embargo, a lo largo de la evolución han desarrollado varias redes sofisticadas de transducción de señales que mitigan el estrés de manera efectiva. A nivel molecular, por ejemplo, los factores de transcripción de choque térmico (HSF) regulan las redes de señalización e inducen una respuesta al factor estresante mediante la regulación de la expresión de proteínas chaperonas, como las HSP, para garantizar la supervivencia de la planta en entornos difíciles (Chen et al., 2018).

A pesar de que existen estudios sobre HSP en diversas especies de plantas, no se había llevado a cabo un estudio específico de genes que codifican para HSP17.8, HSP70 y HSP90 en *C. papaya*. Por lo tanto, para contestar la primera pregunta de investigación e hipótesis de este trabajo de tesis que plantea que, existen secuencias homólogas de genes que codifican para estas HSP de *A. thaliana* en el genoma de *C. papaya* debido a que son proteínas altamente conservadas entre especies, se llevó a cabo un análisis *in silico* de estos genes en *C. papaya* Sun up.

Los resultados obtenidos indicaron que, efectivamente, existen secuencias homólogas de estos genes en el genoma de *C. papaya* a partir de sus ortólogos de *A. thaliana*. Específicamente, se encontraron 5 genes que codifican para CpHSP17.8, 10 genes que codifican para CpHSP70 y 5 genes que codifican para CpHSP90. Adicionalmente, la identificación de dominios y estructuras proteicas 3D mostraron que las familias HSP son altamente conservadas entre *C. papaya* y *A. thaliana*. Estudios de todo el genoma en distintas especies de plantas se han enfocado en la búsqueda de genes para las familias HSP. Por ejemplo, para la familia sHSP existen 18 genes en el genoma de *B. distachyon*, 44 genes en el genoma de *Z. mays* y 169 genes en el genoma de *T. aestivum* (Li et al., 2021; Qi et al., 2022; Kumar et al., 2020). Un estudio filogenético realizado por Qi (2022), para explorar las relaciones evolutivas de la familia sHSP entre *Z. mays*, *A. thaliana*, *O. sativa* y *S. tuberosum*, obtuvo como resultado que las proteínas se dividían en 11 categorías de acuerdo a su ubicación subcelular. De esta forma, se localizaban en el citoplasma y el núcleo (C), subdividido en CI, CII, CIII, CV, CVI y CVIII debido a la falta de una señal de orientación específica, retículo endoplasmático (RE), peroxisoma (Po), mitocondria (M) y plasma (P). De esta forma, la relación filogenética indicó la conservación y diferencia de las sHSP en la evolución de las plantas, así como, la función específica de las sHSP en cada categoría.

Así mismo, un estudio realizado por Kumar (2020), entre la relación filogenética de 753 HSP identificadas en trigo, obtuvo como resultado que todas las proteínas TaHSP se agruparon dentro de sus respectivas subfamilias. De igual manera, según Yan (2020) las relaciones evolutivas entre sHSP, HSP70 y HSP90 de *A. thaliana*, *O. sativa*, *B. distachyon* y *C. songorica* indicaron que las familias se agrupaban según su respectiva familia y ubicación subcelular con ciertas excepciones de la familia sHSP cuyas subclasificaciones fueron específicas para *A. thaliana* o gramíneas. Esto comprueba los resultados obtenidos en este trabajo, en donde los subclados de los árboles filogenéticos de cada familia HSP entre *C. papaya* y *A. thaliana* se dividían según su ubicación subcelular. Adicionalmente, las proteínas de cada familia HSP (CpHSP70 y CpHSP90) compartían los mismos motivos según su localización subcelular, lo que comprueba distintos roles funcionales in vivo en función de su ubicación. Estos resultados son importantes porque proporcionan una mayor comprensión de la evolución y función de las proteínas HSP en las plantas. La presencia de motivos conservados asociados a la ubicación celular indica roles específicos de las HSP en diferentes partes de la célula que puede desempeñar funciones clave en la respuesta al estrés y demás procesos celulares como, el plegamiento correcto o translocación de proteínas específicas (Qi et al., 2022).

Para responder la segunda pregunta de investigación y corroborar su hipótesis que establece que, existen diferencias en la respuesta fisiológica entre *C. papaya* cv Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura, se realizó un análisis fisiológico sobre el efecto del estrés térmico en dos genotipos de *C. papaya* cv Maradol y silvestre. Los resultados obtenidos indicaron que, efectivamente, existen diferencias en la respuesta fisiológica de estos genotipos ante dicho estrés.

En condiciones de alta temperatura se producen alteraciones en la actividad fotosintética y el PSII es uno de los principales componentes afectados por el estrés térmico en el transporte de electrones, lo que se refleja en cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila (Zhu et al., 2021). Los resultados indicaron que durante el tratamiento a 50°C la emisión de fluorescencia en el PSII se vio afectada para ambos genotipos. Sin embargo, el genotipo silvestre presentó una menor afectación en comparación con el genotipo Maradol. Además, durante el período de recuperación, el genotipo silvestre mostró una mejor recuperación en la actividad del PSII en comparación con su variedad comercial.

De la misma manera, el estrés por alta temperatura afecta negativamente procesos fisiológicos como; la fotosíntesis, transpiración, conductancia, termo estabilidad de la membrana y regulación osmótica (Zhao et al., 2020). Sin embargo, las plantas han desarrollado estrategias adaptativas

para enfrentar estas situaciones y minimizar los efectos negativos en su crecimiento, desarrollo y productividad (Jedmowski & Bruggemann., 2015).

A partir del análisis de intercambio gaseoso, se relacionó que el mayor nivel de conductancia y transpiración encontrado en el genotipo silvestre se atribuía al mecanismo de enfriamiento de las hojas que se activa cuando existe estrés debido a altas temperaturas. Si hay suficiente disponibilidad de agua, las hojas pueden transpirar libremente y utilizar este mecanismo de enfriamiento para hacer frente a las condiciones de calor intenso. Este mecanismo permite al genotipo silvestre enfrentar olas cortas de calor y mantener la homeostasis térmica en las hojas. En contraste, el genotipo Maradol, al tener una conductancia y transpiración más baja, podría ser más sensible al estrés por altas temperaturas, ya que no puede enfriar sus hojas de manera eficiente.

De igual forma, el estrés por alta temperatura puede desencadenar la desestabilización de las membranas celulares, lo que puede resultar en una mayor permeabilidad y pérdida de electrolitos de las células (Demidchik et al., 2014). Sin embargo, según los resultados obtenidos, el genotipo silvestre parece tener una mayor capacidad para mantener la integridad de sus membranas celulares en condiciones de estrés térmico, lo que resulta en una menor pérdida de electrolitos en comparación con el genotipo Maradol. Lo que sugiere que, el genotipo silvestre puede tener mecanismos adaptativos más eficientes para proteger y mantener la integridad de sus membranas celulares frente al estrés por alta temperatura. Estos mecanismos podrían incluir la síntesis y acumulación de compuestos protectores como lípidos, proteínas de choque térmico (HSP) y antioxidantes, que ayudan a mitigar los efectos negativos del estrés térmico en las membranas celulares (Alhaithloul., 2019; Niu & Xiang., 2018).

Por otro lado, se ha documentado que el proceso de domesticación de las plantas cultivadas ha resultado en una reducción de la diversidad genética en comparación con sus parientes silvestres. Los genotipos silvestres pueden albergar genes que confieren tolerancia a estrés abiótico o biótico. Por lo que, son valiosos recursos genéticos que se utilizan en el mejoramiento vegetal para mejorar los parámetros fisiológicos y fortalecer la resistencia y adaptabilidad de las plantas cultivadas (Zhang et al., 2017).

Por consiguiente, a partir de la tercera pregunta de investigación e hipótesis formuladas en la presente tesis, se realizó un análisis de expresión de genes que codifican para HSP17.8, HSP70 y HSP90 en *C. papaya* cv Maradol y silvestre para determinar si el genotipo silvestre, al ser una especie no domesticada, presentaba mayor expresión de estos genes en comparación con su

cultivar comercial, lo que podría indicar una mayor capacidad de tolerancia al estrés térmico y estar relacionado con una mejor respuesta fisiológica ante el estrés.

Los resultados de expresión cuantitativa indicaron que existe mayor expresión de *Cphsp90-4* en el genotipo silvestre. La mayor expresión de este gen en el genotipo silvestre de papaya podría indicar una respuesta adaptativa más robusta al estrés térmico en comparación con su cultivar comercial. Así mismo, estos resultados son consistentes con diversos estudios que han demostrado la relación de HSP en la protección de otras proteínas en condiciones de estrés, evitando su desnaturalización y promoviendo su correcto plegamiento (Niu & Xiang., 2018; Chen et al., 2017; Trösch et al., 2015)

Un estudio realizado por Chen (2017), en *A. thaliana* reveló que HSP21 tiene la capacidad de unirse y estabilizar las proteínas D1 y D2 del PSII cuando se activa la vía de señalización retrógrada asociada a GUN5. Esta vía de señalización es un mecanismo de comunicación entre los cloroplastos y el núcleo celular, que se activa en respuesta a diversas tensiones ambientales, incluido el estrés térmico. Cuando se activa la vía de señalización asociada a GUN5 se produce un aumento en la expresión de HSP21, la cual se dirige a los cloroplastos y se une específicamente a D1 y D2 para protegerlas de la desnaturalización y mantener la funcionalidad del PSII durante el estrés por alta temperatura (Chen et al., 2017).

En un estudio realizado por Tan (2011), en plantas de tabaco, el estrés térmico (43°C por 2h) provocó que existiera una disminución de la tasa de fotosíntesis neta, así como, de la eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) y el índice de rendimiento PI_{abs} . Sin embargo, en plantas tratadas previamente con $CaCl_2$ antes del choque térmico, observaron una menor disminución de la fotosíntesis y la relación de fluorescencia F_v/F_m . De la misma forma el índice PI_{abs} fue mayor en plantas tratadas con $CaCl_2$ después del tratamiento con calor, que en los tratamientos control. Adicionalmente, los niveles de proteína HSP70 se incrementaron después del estrés por temperatura. Sin embargo, la aplicación de $CaCl_2$ incremento la acumulación de esta proteína ante alta temperatura. Los autores señalan que HSP70 puede participar en la fotoprotección y reparación del PSII. De igual forma, HSP70 podría interactuar con secuencias polipeptídicas de la proteína D1 y otras proteínas de reacción del PSII, así como, en la síntesis de novo de estas proteínas, asegurando su correcta plegación y ensamble para la formación de complejos funcionales y estables durante estrés por alta temperatura. De igual forma, una mayor acumulación de HSP70 en plantas tratadas con $CaCl_2$ podría promover la disociación del complejo HSF-HSP70 para que HSF se una a los elementos de respuesta y activar la transcripción de genes *hsp* y síntesis de proteínas HSP (Tan et al., 2011).

Por otro lado, existe evidencia de la interacción de HSP90 con la importación de proteínas del cloroplasto (Schweiger et al., 2013). Mas de 2000 proteínas de los cloroplastos son codificadas por el genoma nuclear (Tichá et al., 2020). Según un estudio realizado por Schweiger (2013), con proteínas HSP70 y HSP90 de *A. thaliana* sobre expresadas en *E. coli* encontraron que existe afinidad de unión con la proteína Toc64 en la envoltura externa de los cloroplastos, que está involucrada con la exportación de proteínas desde el citosol hacia los cloroplastos. HSP70 y HSP90 pueden interactuar con las preproteínas en el citosol para asegurar su correcto ensamblaje dentro del orgánulo.

Así mismo, HSP90, ha sido implicada en la regulación de la transferencia de señales al núcleo y desempeña un papel importante en la modulación de genes relacionados con la fotosíntesis y genes de respuesta a estrés en plantas, lo que permite una adaptación y supervivencia más eficiente en situaciones adversas al proporcionar una conexión entre la respuesta al estrés y la regulación de procesos clave para la planta (Trösch et al., 2015).

De igual forma, HSP70 del cloroplasto participa en la reparación del PSII bajo estrés y se ve afectada por el estado redox del cloroplasto. En condiciones de estrés oxidativo, el incremento de ROS afecta a las proteínas y al funcionamiento de orgánulos. HSP70 responde a estos cambios como una respuesta adaptativa para proteger y reparar el PSII dañado y, mantener la eficiencia de la fotosíntesis en condiciones de estrés (Trösch et al., 2015). En *S. tuberosum* se observó que la expresión de genes *hsp70* en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico tendía a ser diferente. Por ejemplo, *Sthsp70-7* que respondía a estrés por sequía era regulado a la baja ante estrés por temperatura y condiciones salinas, lo que indicó diferentes vías de señalización, esto a su vez, sustenta la compleja red de regulación para las vías de señalización HSP (Liu et al., 2018).

Por lo tanto, podría asociarse que la mejor eficiencia fotoquímica y actividad fotosintética del PSII en el genotipo silvestre esté relacionada con una mayor expresión de sHSP, HSP70 y HSP90 al proteger proteínas, que serán importadas a la mitocondria o cloroplastos, contra la desnaturalización y agregación inducidas por el estrés térmico (figura 5.1).

La mayoría de las proteínas de los cloroplastos y las mitocondrias se sintetizan en el citoplasma a partir de genes nucleares para, posteriormente, importarse a estos orgánulos. Durante el proceso de importación, las proteínas sufren cambios conformacionales y ensamblaje correcto para adquirir su estructura funcional y ser transportadas a su ubicación correcta. En este contexto, las HSP, particularmente HSP70 coopera con otras chaperonas para el correcto

plegamiento, replegamiento y desagregación de proteínas. De esta forma, las HSP ayudan a mantener la calidad y funcionalidad de las proteínas importadas, asegurando que se plieguen correctamente y evitando su agregación o inactivación debido al estrés o condiciones adversas (Niu & Xiang., 2018). Adicionalmente, HSP70 participa en el mantenimiento de la integridad y función de las proteínas de membrana y existentes en los orgánulos al eliminar proteínas que han sido dañadas o desnaturalizadas (Niu & Xiang., 2018).

Cuando las plantas están expuestas a altas temperaturas, las proteínas de membrana pueden sufrir cambios en su estructura tridimensional debido a la denaturación térmica. La sobreexpresión de HSP en respuesta al estrés ayudan a prevenir la agregación y el colapso de las proteínas de membrana, así como a facilitar su correcto plegamiento y funcionamiento lo que ayuda a mantener la función celular y la integridad de las estructuras en condiciones de estrés térmico (Niu & Xiang., 2018).

Una de las funciones clave de las sHSP es estabilizar las bicapas lipídicas de las membranas celulares, incluyendo la membrana plasmática. Ante incremento por temperatura, las bicapas lipídicas tienen a volverse más fluidas, lo que compromete la integridad y función de la membrana. Las sHSP se unen a las bicapas lipídicas y ayudan a mantener su estructura y rigidez, evitando así la pérdida de la integridad de membrana plasmática. Adicionalmente las sHSP se asocian con otras chaperonas, proteínas y lípidos para formar complejos multiprotéicos que pueden actuar como una barrera protectora y participar en la reparación y replegamiento de proteínas dañadas por el estrés térmico (Bourgine & Guihur., 2021; Haslbeck & Vierling., 2015; Horváth et al., 2008).

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática que se interactúan con proteínas implicadas en el transporte vesicular y mecanismos de señalización. Se ha sugerido que las balsas lipídicas podrían proporcionar un entorno favorable para las interacciones entre las HSP y otras proteínas de membrana, lo que podría tener un impacto en la regulación de las respuestas celulares al estrés térmico (Niu & Xiang., 2018). A pesar de que la mayor parte de la evidencia de estas interacciones proviene de estudios en mamíferos (Maio & Hightower., 2021), se ha sugerido que ciertas HSP en plantas podrían tener funciones similares en la membrana plasmática, estas funciones podrían incluir el reclutamiento de proteínas de señalización, el plegamiento de proteínas de membrana, translocación de polipéptidos y la remodelación y protección de la membrana plasmática bajo estrés celular (Niu & Xiang., 2018).

Por lo tanto, el menor porcentaje de fuga de electrolitos encontrado en el genotipo silvestre podría estar relacionado con la sobreexpresión de HSP70 y sHSP para prevenir la desnaturalización y agregación de las proteínas de membrana plasmática. Adicionalmente, las HSP pueden interactuar con otras proteínas de membrana y participar en la formación de complejos proteicos que ayudan a mantener la integridad de la membrana plasmática durante estrés por incremento de temperatura (figura 5.1).

Por otro lado, cuando las plantas se enfrentan a altas temperaturas pueden acumular prolina en sus tejidos como parte de su mecanismo de adaptación. Este aminoácido puede actuar como un osmolito para evitar la pérdida de agua, protector de membranas celulares para preservar la integridad de las células y como antioxidante no enzimático al neutralizar ROS y proteger a la célula del daño oxidativo (Yan et al., 2020).

En el estudio realizado por Yan (2020), en plantas de *C. songorica* sometidas a 40°C por 72h se identificó al metabolismo de la prolina entre las vías de genes expresados diferencialmente (DEGs). Adicionalmente, el contenido de prolina fue significativamente mayor en plantas bajo estrés térmico que en condiciones control. De igual manera, identificaron 84 genes *Cshsp* entre sHSP. HSP70 y HSP90, de los cuales el 72.7% estuvieron regulados a la alta bajo estrés por incremento de temperatura.

Si bien los dos genotipos de *C. papaya* (Maradol y silvestre) acumularon prolina estos resultados respaldan la obtenido en este trabajo de tesis en el cual la prolina se acumula significativamente cuando existe estrés por alta temperatura al actuar como un osmolito compatible y proteger las estructuras celulares y las proteínas al equilibrar los niveles de agua y regular la presión osmótica. Adicionalmente, puede neutralizar los radicales libres y proteger a las células del daño oxidativo (figura 5.1).

A pesar de que las HSP no estén directamente involucradas en la síntesis de enzimas antioxidantes u osmolitos, desempeñan un papel crucial en la protección y estabilización de estas proteínas durante estrés por alta temperatura, al evitar su desnaturalización y asegurar su funcionalidad, lo que es esencial para la supervivencia celular bajo condiciones de estrés térmico.

Finalmente, si bien el perfil de expresión de las familias HSP estudiadas no incluyó HSP específicas de organelos, resulta interesante evaluar los niveles de expresión de estas HSP ante incremento de temperatura en *C. papaya* cv Maradol y silvestre en investigaciones futuras. Esto permitiría comprender mejor la respuesta adaptativa de las plantas a las condiciones de estrés térmico y la contribución de las HSP de cloroplastos en la protección y el mantenimiento de la

fotosíntesis eficiente. Adicionalmente, es necesario mencionar que la función e interacciones de HSP en la regulación de la transferencia de señales y la expresión génica en plantas son áreas de investigación activas.

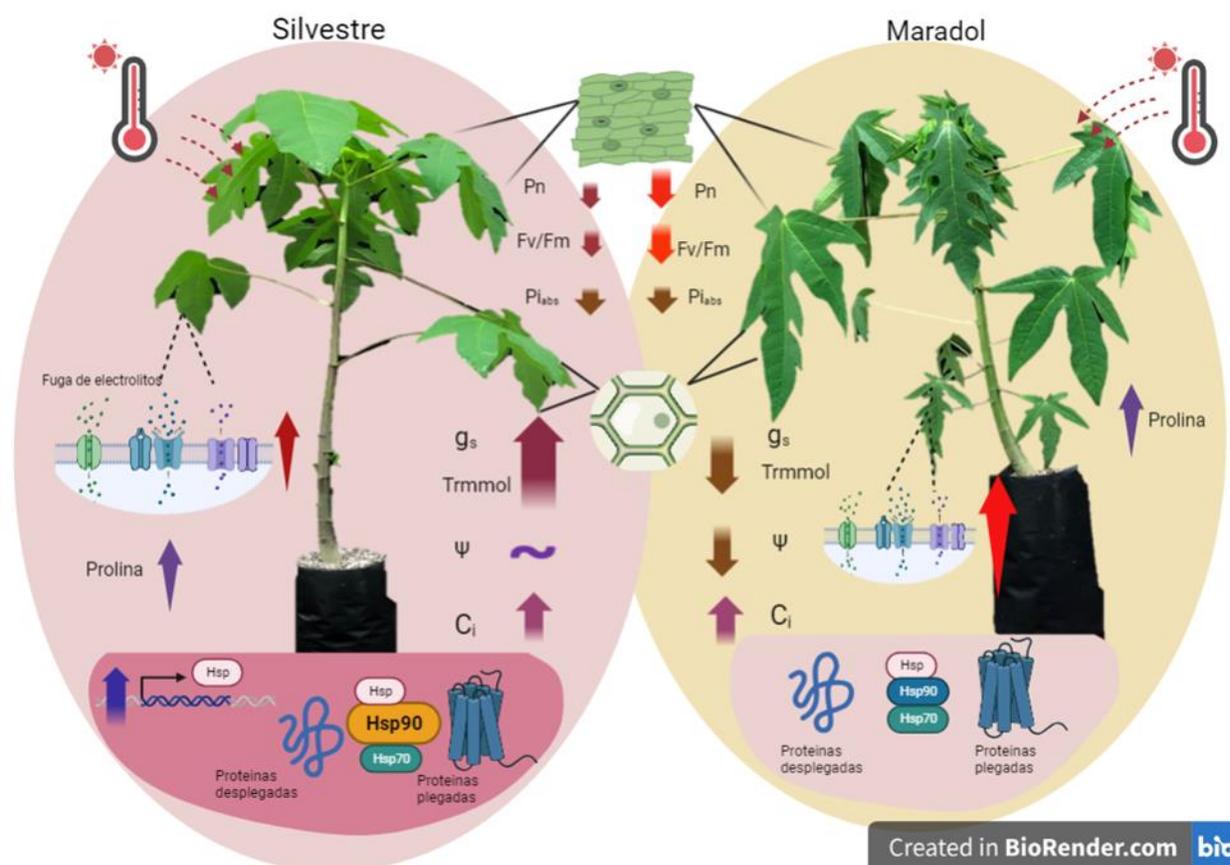


Figura 5.1. Modelo hipotético de la participación de HSP en el plegamiento correcto de proteínas desnaturalizadas. El estrés por altas temperaturas puede afectar la eficiencia del fotosistema II y comprometer la fotosíntesis, como resultado el índice de rendimiento PI_{abs} y la relación de fluorescencia F_v/F_m disminuyen, lo que afecta la capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis de manera efectiva. En respuesta al estrés, las plantas pueden desencadenar una serie de respuestas fisiológicas, así como la acumulación de osmolitos, como la prolina para protegerse y adaptarse a las condiciones adversas. De la misma forma, la alta temperatura puede romper los enlaces no covalentes que mantienen la estructura tridimensional de las proteínas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, como resultado las proteínas se despliegan y pierden su función biológica. Esto es especialmente relevante en proteínas involucradas en la fotosíntesis y en aquellas que se están importando a los organelos celulares. De esta forma, las HSP ayudan al correcto plegamiento de proteínas desplegadas o recién sintetizadas al evitar la formación de agregados no funcionales proveyendo de cito protección a la célula. Modelo creado con BioRender.com

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

- A partir del análisis bioinformático se identificaron 5 genes *Cphsp17.8* (*Cphsp17.8-1* al 5), 10 genes *Cphsp70* (*Cphsp70-1* al 10) y 5 genes *Cphsp90* (*Cphsp90-1* al 5) con motivos y dominios característicos de cada familia HSP. Estos hallazgos proporcionan información importante sobre la caracterización y distribución de HSP en *C. papaya*, lo que podría tener implicaciones en su respuesta a estrés y en su desarrollo y adaptación a diferentes condiciones ambientales.
- El análisis fisiológico determinó que el genotipo silvestre presentó menor disminución de la eficiencia fotosintética (Fv/Fm), tasa de fotosíntesis y daño del PSII (puntos de inflexión O-J-I-P) durante el tratamiento de estrés por alta temperatura (2h a 50°C) que el genotipo Maradol. Adicionalmente, el nivel de conductancia y transpiración fue mayor en el genotipo silvestre, lo que puede estar asociado con una mejor capacidad para enfriar las hojas y sobrevivir olas cortas de calor cuando existe suficiente agua en el suelo.
- De igual manera el genotipo silvestre presentó menor fuga de iones, lo que indica, una mayor estabilidad de la membrana en comparación con el genotipo Maradol durante el tratamiento con alta temperatura, lo que sugiere una mayor tolerancia al estrés térmico.
- El estado hídrico Ψ_H de *C. papaya* cv Maradol y silvestre se mantuvo igual en el genotipo silvestre durante el incremento de temperatura, mientras que Maradol experimentó una mayor alteración y disminución en el movimiento del agua.
- Los análisis de expresión de genes *Cphsp17.8* (*Cphsp17.8-2* y *Cphsp17.8-2*), *Cphsp70* (*Cphsp70-1*, *Cphsp70-6*, *Cphsp70-7* y *Cphsp70-8*) y *Cphsp90* (*Cphsp90-1* y *Cphsp90-4*) determinaron que existen genes que mantienen una expresión constitutiva independiente de la temperatura, como: *Cphsp70-1*, *Cphsp70-6* y *Cphsp90-1*, mientras que otros presentaron una expresión rápida y transitoria en respuesta al incremento de temperatura; *Cphsp17.8-2*, *Cp17.8-3*, *Cphsp70-7*, *Cphsp70-8* y *Cphsp90-4*.
- Por su parte el análisis cuantitativo indicó mayor expresión de *Cphsp90-4* en el genotipo silvestre que el genotipo Maradol. Esta diferencia en la expresión sugiere que el mayor nivel de tolerancia observado en el genotipo silvestre podría estar relacionado con la protección y correcto plegamiento de proteínas de membrana, así como interacción con preproteínas del cloroplasto para asegurar su correcta importación al orgánulo.
- Es posible que durante el proceso de domesticación el genotipo comercial haya perdido rasgos de termotolerancia que el genotipo silvestre aún mantiene. La conservación de la diversidad genética de los genotipos silvestres es fundamental para su utilización en

programas de mejoramiento genético y desarrollar cultivos más resistentes y adaptados a condiciones climáticas adversas, como alta temperatura.

5.2 PERSPECTIVAS

Ante la información obtenida en este trabajo de tesis y las diferencias observadas entre *C. papaya* cv Maradol y silvestre se generaron nuevas interrogantes para futuras investigaciones. Estas preguntas pueden brindar nueva información acerca de las características genéticas y fisiológicas que subyacen a las diferencias encontradas en la tolerancia a estrés por alta temperatura entre ambos genotipos para aplicar estrategias de mejoramiento genético en papaya.

- El presente estudio identificó genes que codifican para HSP17.8, HSP70 y HSP90 en *C. papaya*. Sin embargo, para realizar un análisis completo de HSP en el genoma de *C. papaya*, es necesario identificar todas las familias HSP presentes en esta especie. Estos análisis proporcionarían información sobre las características estructurales y funcionales de las HSP en *C. papaya* y podría ayudar a comprender mejor su papel en la respuesta a condiciones ambientales adversas.
- La interacción entre la fisiología y la bioquímica de las plantas es fundamental para mantener la homeostasis y la supervivencia en entornos desafiantes. Por lo tanto, se puede medir la actividad de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa ante condiciones de estrés por alta temperatura en *C. papaya* Maradol y silvestre. Adicionalmente, se podrían realizar análisis para evaluar otros parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo como, los niveles de ROS, niveles de peroxidación lipídica y niveles de antioxidantes no enzimáticos, como compuestos fenólicos. Esto proporcionaría una mejor comprensión de las diferencias entre estos genotipos y proporcionaría información valiosa para futuras investigaciones y mejoramiento genético de papaya en relación con su tolerancia al estrés.
- Una mayor transpiración del genotipo silvestre se asoció con la capacidad que tiene para hacer frente a las olas cortas de calor, al enfriar sus hojas cuando existe suficiente agua en el suelo. Por lo tanto, se puede medir la temperatura de las hojas del genotipo Maradol y silvestre para determinar diferencias en este parámetro.
- Los niveles de expresión de HSP entre los genotipos Maradol y silvestre es una respuesta ante las diferencias encontradas entre estos genotipos de papaya. Por lo que, evaluar el nivel de expresión cuantitativa de todas las HSP encontradas en este estudio podría dilucidar nueva información sobre el comportamiento de estos dos genotipos ante estrés por alta temperatura. De la misma forma, es necesario determinar si existen diferencias

en la regulación transcripcional o en la estabilidad de las proteínas HSP entre el genotipo silvestre y Maradol.

- Por otra parte, se podría evaluar el contenido específico de estas proteínas (HSP) a través de técnicas de inmunodetección como, Western Blot, para poder corroborar los datos obtenidos a nivel molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- Alhathloul, H. A. S. (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. <https://doi.org/10.3390/plants8100416>
- Ali, M. M. U., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C., & Pearl, L. H. (2006). Crystal structure of an Hsp90–nucleotide–p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440(7087), 1013–1017. <https://doi.org/10.1038/nature04716>
- Aradhya, M., & Manshardt, R. (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genetic Resources*. Recuperado el 11 de mayo del 2018 de <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008786531609>
- Asea, A. A. A., Calderwood, S. K., & Kaur, P. (2016). Heat shock proteins and plants (1ª ed.). Springer International Publishing.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.
- Bahuguna, R. N., & Jagadish, K. S. V. (2015). Temperature regulation of plant phenological development. *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.10.007>
- Bajji, M., Kinet, J.-M., & Lutts, S. (2002). *Plant growth regulation*, 36(1), 61–70. <https://doi.org/10.1023/a:1014732714549>
- Bheemanahalli, R., Vennam, R. R., Ramamoorthy, P., & Reddy, K. R. (2022). Effects of post-flowering heat and drought stresses on physiology, yield, and quality in maize (*Zea mays* L.). *Plant Stress*, 6(100106), 100106. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100106>
- Binelli, G., & Mascarenhas, J. P. (1990). Arabidopsis: sensitivity of growth to high temperature. *Developmental Genetics*, 11, 294–298. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020110408>

-
-
- Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4, 273.
- Bogantes Arias, A., & Mora Newcomer, E. (2017). Influencia del genotipo y la temperatura sobre la carpelodia en papaya. *Agronomía mesoamericana: órgano divulgativo del PCCMCA, Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos y Animales*, 28(3), 577.
- Bourgine, B., & Guihur, A. (2021). Heat shock signaling in land plants: From plasma membrane sensing to the transcription of small heat shock proteins. *Frontiers in Plant Science*, 12, 710801.
- Box, E. O. (2016). Vegetation Structure and Function at Multiple Spatial, Temporal and Conceptual Scales. In *World Bioclimatic Zonation* (pp. 3–52). *Springer, Cham*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-21452-8>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2a ed.). Wiley-Blackwell.
- Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351–366.
- Centro Nacional de Información Ambiental., M. I. (2023). Global Climate Report - July 2021. Noaa.gov. Recuperado el 24 de octubre de 2021, de <https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/202107>
- Chen, J., Gao, T., Wan, S., Zhang, Y., Yang, J., Yu, Y., & Wang, W. (2018). Genome-wide identification, classification and expression analysis of the HSP gene superfamily in tea plant (*Camellia sinensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2633. <https://doi.org/10.3390/ijms19092633>
- Cohen, S. P., & Leach, J. E. (2020). High temperature-induced plant disease susceptibility: more than the sum of its parts. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 235–241.

-
-
- Cowen, L. E., & Lindquist, S. (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5744), 2185–2189. <https://doi.org/10.1126/science.1118370>
- 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). Disponible en: www.conabio.gob.mx
- Chan-León, A. C., Estrella-Maldonado, H., Dubé, P., Fuentes Ortiz, G., Espadas-Gil, F., Talavera May, C., Ramírez Prado, J., Desjardins, Y., & Santamaría, J. M. (2017). The high content of β -carotene present in orange-pulp fruits of *Carica papaya* L. is not correlated with a high expression of the CpLCY- β 2 gene. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 100(Pt 2), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.017>
- Chávez-Pesqueira, M., & Núñez-Farfán, J. (2017). Domestication and genetics of papaya: A review. *Frontiers in ecology and evolution*, 5. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00155>
- Chen, S.-T., He, N.-Y., Chen, J.-H., & Guo, F.-Q. (2017). Identification of core subunits of photosystem II as action sites of HSP21, which is activated by the GUN5-mediated retrograde pathway in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 89(6), 1106–1118. <https://doi.org/10.1111/tpj.13447>
- Chen, W., Jia, B., Chen, J., Feng, Y., Li, Y., Chen, M., Liu, H., & Yin, Z. (2021). Effects of different planting densities on photosynthesis in maize determined via prompt fluorescence, delayed fluorescence and P700 signals. *Plants*, 10(2), 276. <https://doi.org/10.3390/plants10020276>
- De Maio, A., & Hightower, L. (2021). The interaction of heat shock proteins with cellular membranes: a historical perspective. *Cell Stress & Chaperones*, 26(5), 769–783. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01228-y>
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin, V. (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. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>

-
-
- dos Santos, T. B., Ribas, A. F., de Souza, S. G. H., Budzinski, I. G. F., & Domingues, D. S. (2022). Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: A review. *Stresses*, 2(1), 113–135. <https://doi.org/10.3390/stresses2010009>
- Dotto, J. M., & Abihudi, S. A. (2021). Nutraceutical value of *Carica papaya*: A review. *Scientific African*, 13(e00933), e00933.
- FAO. 2020. Las principales frutas tropicales Análisis del mercado 2018. Roma.
- Feller, U., & Vaseva, I. I. (2014). Extreme climatic events: impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. *Frontiers in environmental science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00039>.
- Filaček, A., Živčák, M., Ferroni, L., Barboričová, M., Gašparovič, K., Yang, X., Landi, M., & Brestič, M. (2022). Pre-acclimation to elevated temperature stabilizes the activity of photosystem I in wheat plants exposed to an episode of severe heat stress. *Plants*, 11(5), 616. <https://doi.org/10.3390/plants11050616>
- Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2014). Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. En *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 3–15). Springer New York.
- Füzy, A., Kovács, R., Cseresnyés, I., Parádi, I., Szili-Kovács, T., Kelemen, B., Rajkai, K., & Takács, T. (2019). Selection of plant physiological parameters to detect stress effects in pot experiments using principal component analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(5). <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2842-9>
- Girón- Ramírez, A., Peña-Rodríguez, L. M., Escalante-Erosa, F., Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2021). Identification of the SHINE clade of AP2/ERF domain transcription factors genes in *Carica papaya*; Their gene expression and their possible role in wax accumulation and water deficit stress tolerance in a wild and a commercial papaya genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 183(104341), 104341. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104341>
- Grover, A., Mittal, D., Negi, M., & Lavania, D. (2013). Generating high temperature tolerant transgenic plants: Achievements and challenges. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 205–206, 38–47.

-
-
- Guihur, A., Rebeaud, M. E., & Goloubinoff, P. (2022). How do plants feel the heat and survive? *Trends in Biochemical Sciences*, 47(10), 824–838. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.05.004>
- Guo, M., Liu, J.-H., Ma, X., Zhai, Y.-F., Gong, Z.-H., & Lu, M.-H. (2016). Genome-wide analysis of the Hsp70 family genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional identification of CaHsp70-2 involvement in heat stress. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 252, 246–256.
- Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E., & Scharf, K.-D. (2011). Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *The Plant Cell*, 23(2), 741–755.
- Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4–10.
- Haslbeck, M., & Vierling, E. (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1537–1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
- Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Vígh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(7–8), 1653–1664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012>
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., & Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 3(3), e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
- Huerta-Ocampo, J. Á., Osuna-Castro, J. A., Lino-López, G. J., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, G., De León-Rodríguez, A., & 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.
- Jacob, P., Hirt, H., & Bendahmane, A. (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 405–414. <https://doi.org/10.1111/pbi.12659>

-
- Jedmowski, C., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.020>
- Jespersen, D (2020). Heat shock induced stress tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of acquired tolerance, chapter 10. *Priming Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*, 161-174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817892-8.00010-6>
- Jiang, C., Bi, Y., Li, M., Zhang, R., Feng, S., & Ming, F. (2020). A small heat shock protein gene (RcHSP17.8) from Chinese rose confers resistance to various abiotic stresses in transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *141*(2), 407–415.
- Jiang, C., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X., Shi, J., Li, M., & Ming, F. (2009). A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, *32*(8), 1046–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01987.x>
- Jiang, C., Bi, Y., Zhang, R., & Feng, S. (2020). Expression of RcHSP70, heat shock protein 70 gene from Chinese rose, enhances host resistance to abiotic stresses. *Scientific Reports*, *10*(1), 2445. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58745-6>
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., Łukasik, I., Goltsev, V., & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(4). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>
- Kanzaki H, Saitoh H, Ito A, Fujisawa S, Kamoun S, Katou S, Yoshioka H, Terauchi R (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* *4*:383–391
- Kavi Kishor, P. B., Suravajhala, P., Rathnagiri, P., & Sreenivasulu, N. (2022). Intriguing role of proline in redox potential conferring high temperature stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 867531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.867531>
-

-
-
- Krebs, J. E., Kilpatrick, S. T., & Goldstein, E. S. (2013). *Lewin's Genes XI*. Jones and Bartlett.
- Krishna, P., & Gloor, G. (2001). The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 238.
- Krishna, K. L., Paridhavi, M., & Patel, J. A. (2008). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural product radiance*. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5695>
- Kumar, A., Sharma, S., Chunduri, V., Kaur, A., Kaur, S., Malhotra, N., Kumar, A., Kapoor, P., Kumari, A., Kaur, J., Sonah, H., & Garg, M. (2020). Genome-wide identification and characterization of heat shock protein family reveals role in development and stress conditions in *Triticum aestivum* L. *Scientific Reports*, 10(1), 7858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64746-2>
- Li, N., Jiang, M., Li, P., & Li, X. (2021). Identification, expression, and functional analysis of Hsf and Hsp20 gene families in *Brachypodium distachyon* under heat stress. *PeerJ*, 9(e12267), e12267. <https://doi.org/10.7717/peerj.12267>
- Li, Q.-B., Haskell, D. W., & Guy, C. L. (1999). *Plant molecular biology*, 39(1), 21–34. <https://doi.org/10.1023/a:1006100532501>
- Li, W., Chen, Y., Ye, M., Wang, D., & Chen, Q. (2020). Evolutionary history of the heat shock protein 90 (Hsp90) family of 43 plants and characterization of Hsp90s in *Solanum tuberosum*. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6679–6691. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05722-x>
- Li, J., Zhang, J., Jia, H., Li, Y., Xu, X., Wang, L., & Lu, M. (2016). The *Populus trichocarpa* PtHSP17.8 involved in heat and salt stress tolerances. *Plant Cell Reports*, 35(8), 1587–1599.
- Lin, B.-L., Wang, J.-S., Liu, H.-C., Chen, R.-W., Meyer, Y., Barakat, A., & Delseny, M. (2001). β -cystf1wr; Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 201. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006<0201:gaoths>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0201:gaoths>2.0.co;2)

-
- Liu, J., Pang, X., Cheng, Y., Yin, Y., Zhang, Q., Su, W., Hu, B., Guo, Q., Ha, S., Zhang, J., & Wan, H. (2018). The Hsp70 gene family in *Solanum tuberosum*: Genome-wide identification, phylogeny, and expression patterns. *Scientific Reports*, *8*(1), 16628. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34878-7>
- Meehl, G. A., Stocker, T. F., Collins, W. D., Friedlingstein, A. T., Gaye, A. T., Gregory, J. M., Zhao, Z. (2007). Global Climate Projections. *Cambridge University Press*, Cambridge, 1–88. <https://doi.org/10.1080/07341510601092191>
- Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., Yadav, M., & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation, and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, *5*(12), e02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
- Meetam, M., Sripintusorn, N., Songnuan, W., Siri wattanakul, U., & Pichakum, A. (2020). Assessment of physiological parameters to determine drought tolerance of plants for extensive green roof architecture in tropical areas. *Urban Forestry & Urban Greening*, *56*(126874), 126874. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2020.126874>
- Moreno, Sergio & Perales-Vela, Hugo & Alvarez, Martha. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. *27*. 119-129.
- Nankishore, A., & Farrell, A. D. (2016). The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, *202*, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.006>
- Niu, Y., & Xiang, Y. (2018). An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 915. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00915>
- Overdieck, D. (2016). CO₂, Temperature, and Trees. Springer Singapore.
- Pandey, B., Kaur, A., Gupta, O. P., Sharma, I., & Sharma, P. (2015). Identification of HSP20 gene family in wheat and barley and their differential expression profiling under heat stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *175*(5), 2427–2446. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1420-2>

-
-
- Panzarini, E., Dwikat, M., Mariano, S., Vergallo, C., & Dini, L. (2014). Administration dependent antioxidant effect of *Carica papaya* seeds water extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2014, 281508.
- Park, C.-J., & Seo, Y.-S. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The Plant Pathology Journal*, 31(4), 323–333. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>
- Qi, H., Chen, X., Luo, S., Fan, H., Guo, J., Zhang, X., Ke, Y., Yang, P., & Yu, F. (2022). Genome-wide identification and characterization of heat shock protein 20 genes in maize. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1397. <https://doi.org/10.3390/life12091397>
- Rehman, A., Atif, R. M., Qayyum, A., Du, X., Hinze, L., & Azhar, M. T. (2020). Genome-wide identification and characterization of HSP70 gene family in four species of cotton. *Genomics*, 112(6), 4442–4453.
- Rivero RM, Mestre TC, Mittler RON, Rubio F, Garcia-Sanchez F, Martinez V. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant Cell and Environment*, 2014; 37:1059–73.
- Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., & Sage, R. F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research*, 182, 30– 42. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.06.011>
- Saidi Y, Finka A, Goloubinoff P (2011). Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol* 190:556–565
- Santamaría Fernández, J (2017). Situación de la industria papayera en México. En G. Herrera Martínez (Ed.), *Situación actual de la papaya* (pp. 14-22). Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.
- Sarkar, N.K., Kundnani, P. & Grover, A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress and Chaperones* 18, 427–437 (2013). <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0395-6>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, [Online]. www.senasica.gob.mx

-
- Servicio Meteorológico Nacional, 2021. Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia. Gob.mx. Recuperado el 24 de octubre de 2021, de <https://smn.conagua.gob.mx/es/>
- Sewelam, N., Kazan, K., Hüdig, M., Maurino, V. G., & Schenk, P. M. (2019). The AtHSP17.4C1 gene expression is mediated by diverse signals that link biotic and abiotic stress factors with ROS and can be a useful molecular marker for oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3201. <https://doi.org/10.3390/ijms20133201>
- Sattar, A., Sher, A., Ijaz, M., Ul-Allah, S., Rizwan, M. S., Hussain, M., Jabran, K., & Cheema, M. A. (2020). Terminal drought and heat stress alter physiological and biochemical attributes in flag leaf of bread wheat. *PLoS One*, 15(5), e0232974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232974>
- Schweiger, R., Soll, J., Jung, K., Heermann, R., & Schwenkert, S. (2013). Quantification of interaction strengths between chaperones and tetratricopeptide repeat domain-containing membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30614–30625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.493015>
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>.
- Song, Z., Pan, F., Yang, C., Jia, H., Jiang, H., He, F., Li, N., Lu, X., & Zhang, H. (2019). Genome-wide identification and expression analysis of HSP90 gene family in *Nicotiana tabacum*. *BMC Genetics*, 20(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0738-8>.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3a ed.). Oxford University Press.
- Talalaiev, O., & Korduym, E. (2014). Expression of small heat shock protein (sHSP) genes in the garden pea (*Pisum sativum*) under slow horizontal clinorotation. *Plant Signaling & Behavior*, 9(6), e29035. <https://doi.org/10.4161/psb.29035>
- Tan, W., Meng, Q. W., Brestic, M., Olsovska, K., & Yang, X. (2011). Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 168(17), 2063–2071. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.06.009>
-

-
-
- Tian, F., Hu, X.-L., Yao, T., Yang, X., Chen, J.-G., Lu, M.-Z., & Zhang, J. (2021). Recent advances in the roles of HSFs and HSPs in heat stress response in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 704905.
- Tichá, T., Samakovli, D., Kuchařová, A., Vavrdová, T., & Šamaj, J. (2020). Multifaceted roles of HEAT SHOCK PROTEIN 90 molecular chaperones in plant development. *Journal of Experimental Botany*, *71*(14), 3966–3985. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa177>
- Trösch, R., Mühlhaus, T., Schroda, M., & Willmund, F. (2015). ATP-dependent molecular chaperones in plastids--More complex than expected. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1847*(9), 872–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.002>
- Tonhati, R., Mello, S. C., Momesso, P., & Pedroso, R. M. (2020). L-proline alleviates heat stress of tomato plants grown under protected environment. *Scientia Horticulturae*, *268*(109370), 109370. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109370>
- Urban, J., Ingwers, M., McGuire, M. A., & Teskey, R. O. (2017). Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signaling & Behavior*, *12*(8), e1356534. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356534>
- USGCRP (U.S. Global Change Research Program). 2017. Climate science special report: Fourth National Climate Assessment, volume I. Wuebbles, D.J., D.W. Fahey, K.A. Hibbard, D.J. Dokken, B.C. Stewart, and T.K. Maycock (eds.). <https://science2017.globalchange.gov>
- Valencia Sandoval, K., Duana Ávila, D., & Hernández Gracia, T. J. (2017). Estudio del mercado de papaya mexicana: un análisis de su competitividad (2001-2015). *Suma de Negocios*, *8*(18), 131–139.
- Vanhove, A.-C., Vermaelen, W., Swennen, R., & Carpentier, S. C. (2015). A look behind the screens: characterization of the HSP70 family during osmotic stress in a non-model crop. *Journal of Proteomics*, *119*, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.014>
- Vavilov NI (1987) Origin and geography of cultivated plants [English Translation by D Löve]. Cambridge University Press, Cambridge

-
-
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heatshock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang, P., Zhao, L., Hou, H., Zhang, H., Huang, Y., Wang, Y., Li, H., Gao, F., Yan, S., & Li, L. (2015). Epigenetic changes are associated with programmed cell death induced by heat stress in seedling leaves of *Zea mays*. *Plant & Cell Physiology*, 56(5), 965–976. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv023>
- Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., & Chen, L. (2019). Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 9(10), 597. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100597>
- Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins - evolutionary and functional diversity. *The New Phytologist*, 227(1), 24–37.
- Xu, J., Xue, C., Xue, D., Zhao, J., Gai, J., Guo, N., & Xing, H. (2013). Overexpression of GmHsp90s, a heat shock protein 90 (Hsp90) gene family cloning from soybean, decrease damage of abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 8(7), e69810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069810>
- Yadav, S., Modi, P., Dave, A., Vijapura, A., Patel, D., & Patel, M. (2020). Effect of abiotic stress on crops. *En Sustainable Crop Production*. IntechOpen.
- Yan, Q., Zong, X., Wu, F., Li, J., Ma, T., Zhao, Y., Ma, Q., Wang, P., Wang, Y., & Zhang, J. (2020). Integrated analysis of co-expression, conserved genes and gene families reveal core regulatory network of heat stress response in *Cleistogenes songorica*, a xerophyte perennial desert plant. *BMC Genomics*, 21(1), 715.
- Yin, M., Hu, R., Song, A., Guan, Z., Chen, F., & Jiang, J. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of HSP70 gene family in *Chrysanthemum lavandulifolium* under heat stress. *Horticulturae*, 9(2), 238. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020238>
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B.-H. (2017). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, 10(1), 5–24. <https://doi.org/10.1111/eva.12434>

-
-
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: Physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117. <https://doi.org/10.3390/ijms22010117>
- Zhu, L., Wen, W., Thorpe, M. R., Hocart, C. H., & Song, X. (2021). Combining heat stress with pre-existing drought exacerbated the effects on chlorophyll fluorescence rise kinetics in four contrasting plant species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10682. <https://doi.org/10.3390/ijms221910682>
- Zou J, Liu C, Liu A, Zou D, Chen X (2012) Overexpression of OsHsp17. 0 and OsHsp23. 7 enhances drought and salt tolerance in rice. *J Plant Physiol* 169(6):628–635
- Zinn, K.E., Tunc-Ozdemir, M., and Harper, J. F. (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J. Exp.Bot.* 61,1959–1968. doi: 10.1093/jxb/erq053