

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Papel de Factores de Transcripción tipo ERF-VII en los mecanismos de tolerancia al anegamiento en *Carica papaya* L.

Tesis que presenta

Nelly Abigail González Oviedo

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2025

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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Nelly Abigail González Oviedo titulado **Papel de Factores de Transcripción tipo ERF-VII en Ios mecanismos de tolerancia al anegamiento en** *Carica papaya* **L., 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.**

Atentamente
Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de junio de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, 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 Federal de Protección a 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 se regirán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

Nelly Abigall González Oviedo

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado **"Iniciativas para la conservación, salvaguarda y uso de colecciones biológicas vivas de Carica papaya L. (Banco in vitro y colecciones vivas), para revalorizar la importancia de poblaciones silvestres, en colaboración con comunidades locales de Yucatán", No. PRONAII-2024-151, aprobado en Convocatoria de CONAHCYT (SECIHTI)** bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (SECIHTY) por la beca asignada número 839763, indispensable para realizar mis estudios.

De igual manera, al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por los cursos, los profesores, la atención por parte de sus investigadores, técnicos, administrativos, ingenieros y personal del invernadero, todos fueron clave para mi formación académica y profesional.

Le agradezco al Instituto Tecnológico de Mérida, así como al Dr. Enrique Sauri y al Dr. Víctor Manuel Moo, por el apoyo con equipos de laboratorio y el asesoramiento.

Le agradezco, en gran medida, a los demás laboratorios del CICY, en especial a las Unidades de Biotecnología, Recursos Naturales y Biología Integrativa, que siempre estuvieron en la mejor disposición, tanto los investigadores como los técnicos, de prestarme algún equipo o reactivo siempre que lo necesité. Así como a los ingenieros de Instrumentación, Ing. César e Ing. Gamaliel.

Especialmente, al Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del CICY, por los recursos y equipos proporcionados, así como a todos los miembros vigentes y egresados con los que tuve la oportunidad de trabajar.

Estoy muy agradecida con mi director de tesis, el Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto tan retador para los dos. Atesoraré siempre su compromiso con mi formación, su guía y paciencia durante todo este tiempo. Así como a la Dra. Gabriela Fuentes Ortíz por su apoyo y retroalimentación en cada fase del trabajo.

Mi sincero agradecimiento a los técnicos: Ing. Eduardo Castillo por su apoyo en el laboratorio, Ing. Roberth Us por sus capacitaciones en el uso de los equipos de Fisiología y al MC. Luis Torres por enseñarme a usar el cromatógrafo de gases; así como a la Dra. Celene Espadas y la Dra. Fabiola Escalante por apoyarme cuando lo necesité y ser siempre tan amables conmigo.

Un agradecimiento especial al Dr. Santy Peraza, Dr. Luis Sáenz y Dr. Bruce Schaffer, por ser parte de mi comité tutorial, por todos sus comentarios, sus preguntas y apoyo a lo largo de estos años, les agradezco tanto la confianza y el que siempre me motivaran a dar más de mí, les

guardo un cariño especial. De la misma forma, a la Dra. Nancy Santana, la Dra. Casandra Reyes y al Dr. Humberto Estrella, por formar sus comentarios para mejorar este trabajo.

A mis compañeros y amigos del CICY, empezando con mis compañeros de laboratorio Yessica, Eduardo, Montserrat, Mauricio, Bris, Amaranta, Erick, porque, a pesar de las dificultades, fuimos un equipo.

También le agradezco al British Council y a Inova Education and Training por la beca asignada para ser mentee en el programa Mentoring in Action – Woman and Girls in STEAM Online. Así como a la Dra. Marina Larios y al grupo de Matca, que me recuerdan que no estoy sola en este camino de mujeres en la ciencia.

A la Dra. Laura Teresa Guzmán, mi mentora, su apoyo fue como agua fresca en el desierto.

Así como a mis amigos Banda y Ángel que, aún en la distancia, me acompañaron siempre.

A Say y Bianca, que se las ingeniaron para visitarme, lo aprecio mucho.

A mis amigas y amigos que hice en Mérida: Tiffany, Grecia, Emmanuel, por ser ese apoyo incondicional, gracias por darme tanto. Su amistad es invaluable para mí.

Y, por último, pero no menos importante, a mi amiga Karina Alducin, por ser una excelente amiga, por acompañarme en todo momento, brindarme su apoyo incondicional, por compartir tanto, incluso cuando no teníamos mucho, gracias amiga.

DEDICATORIAS

A mi madre y hermanas. Ruth Adriana, Monserrat y Ana.

Los motores de mi vida, por ustedes me esfuerzo cada día, para brindarles lo mejor de mí y que lleguemos muy lejos juntas.

A mis abuelos.

Por su apoyo incondicional, me seguiré esforzando para que siempre estén orgullosos de mí.

A mi suegro y mi cuñado. Don Robert y Esaú.

La familia que no sabía que me faltaba, con ese amor sincero que no tengo más que agradecer y esforzarme en merecer.

A mi esposo. Felipe.

Es por ti que este sueño fue posible, aunque a veces parecía pesadilla. Gracias por no soltarme y darme todo de ti para que ambos tengamos un mejor futuro.

Te amo

A mi suegra y a mi amiga hermosa. Mirna y Giselle.

Cuando las perdí, fue el mayor de mis miedos hechos realidad. Sin embargo, sigo aquí, esforzándome por ustedes, porque se lo mucho que les hubiera gustado verme lograrlo. Llevo en mi corazón todos sus consejos y su amor, las voy a querer siempre.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículos:

- González-Oviedo N.A., Fuentes-Ortiz G., Santamaría J.M. 2025. Wild Carica papaya genotype is more waterlogging resilient than its commercial counterpart. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 37: e13. <u>https://doi.org/10.1007/s40626-024-00361-0</u>
- González-Oviedo N.A., Fuentes-Ortiz G., Santamaría J.M. 2025. Physiology of prolonged waterlogging stress in seedlings from wild *Carica papaya* L. plants collected at Yucatan, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 28: e025. <u>http://doi.org/10.56369/tsaes.5281</u>

Congresos:

 González-Oviedo N.A., Fuentes-Ortiz G., Santamaría J.M. Fisiología del estrés por anegamiento prolongado de plantas silvestres de *Carica papaya* provenientes de Yucatán, México. 5to Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal. 23 al 25 de octubre de 2023.

Divulgación:

- González-Oviedo N. A. (Mexican Bioimagen Workshop). 5, noviembre, 2022. Microscopía de plantas inundadas. Facebook. <u>http://facebook.com/photo.php?fbid=144867578293801&set=pb.100083116783180.-</u> <u>2207520000&type=3&locale=es_LA</u>
- González-Oviedo N. A. Etileno, el héroe invisible. Segundo Congreso de La Biozona "Acercándote a la Ciencia 2024". 8 de junio de 2024.
- González-Oviedo N. A. Cicy Casa Abierta 2023. Mérida, Yucatán, México. 9 de noviembre de 2023.
- González-Oviedo N. A. Cicy Casa Abierta 2024. Mérida, Yucatán, México. 24 de octubre de 2024.

ÍNDICE

RESUMENx
ABSTRACTxi
INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO I
1.1. Generalidades de <i>Carica papaya</i> L3
1.1.1 Clasificación taxonómica y descripción de <i>Carica papaya</i> L
1.1.2 Producción en México 4
1.1.3 Requerimientos del cultivo de papaya5
1.1.4 Estrés hídrico en el cultivo de papaya6
1.1.5 El anegamiento como fenómeno edafoclimático6
1.1.7 Factores de Transcripción de respuesta a etileno (ERF)14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN19
HIPÓTESIS19
OBJETIVO GENERAL19
OBJETIVOS PARTICULARES
ESTRATEGA EXPERIMENTAL
CAPÍTULO II
2.1 INTRODUCTION
2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Plant material	I	
2.2.2 Waterlogging	treatments	
2.2.3 Evaluation of	morphological variables	
2.2.4 Experimental	design	23
2.3 RESULTS AND D	DISCUSSION	23
2.3.1. Effect of wate	erlogging on plant Morphology	23
2.3.2 Effect of wate	rlogging on gas exchange parameters	24
2.4 CONCLUSIONS.		
CAPÍTULO III		29
3.1 INTRODUCTION		
3.2 MATERIALS Y M	ETHODS	
3.2.1 Plant material	I and growth conditions	
3.2.2 Experimental	design	31
3.2.2.1 Waterloggir	ng treatment	31
3.2.2.2. Recovery p	process	
3.2.3 Physiological	Parameters	32
3.2.3.3 Electrolyte I	eakage (EL)	
3.2.3.4 Water relati	ons	
3.2.3.5 Dissolved o	xygen	
3.3 RESULTS		34
3.3.1 Collection and	d Characterization of Wild C. papaya Fruits	34

3.3.2 Effects of waterlogging on plant morphology	35
3.3.3 Physiological response to waterlogging	36
3.3.3.1 Dissolved oxygen	
3.3.4 Leaf fluorescence parameters	37
3.3.5 Gas exchange parameters	
3.3.6 Electrolyte leakage (membrane integrity)	41
3.3.7 Leaf water relations	42
3.3.8 Correlations between physiological parameters with Ψw and waterlogging treatments	d with DO under 43
3.4 DISCUSSION	47
3.5 CONCLUSIONS	47
CAPÍTULO IV	51
4.1 INTRODUCCIÓN	51
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	53
4.2.1 Identificación de ERF-VII en el genoma de <i>C. papaya</i> y análisis filo	genético53
4.2.2 Análisis de Identidad y Distancia genética	53
4.2.3 Diseño 3D de las proteínas HRE y RAP	54
4.2.4 Diseño de iniciadores para los genes HRE y RAP	54
4.2.5 Ensayo de expresión de genes ERF-VII en C. papaya en respue	sta al anegamiento
	54
4.3 RESULTADOS	58
4.3.1 Identificación de ERF-VII en el genoma de <i>C. papaya</i>	58

4.3.2 Análisis filogenético de las secuencias de ERF-VII de <i>C. papaya</i> 65
4.3.3 Análisis de Distancia67
4.3.4 Alineamiento e identificación de dominios69
4.3.5 Identificación de motivos conservados72
3.3.6 Diseño 3D de las proteínas ERF-VII de <i>C. papaya</i> 73
4.3.7 Diseño de iniciadores para los genes ERF-VII en <i>C. papaya</i> 74
4.3.8 Expresión de genes ERF-VII en <i>C. papaya</i> en respuesta al anegamiento75
4.4. DISCUSIÓN
4.5 CONCLUSIONES
CAPÍTULO V
5.1 INTRODUCCIÓN
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS90
5.2.1 Cuantificación de etileno foliar en dos genotipos de papaya bajo anegamiento90
5.2.2 Expresión del gen ACO en dos genotipos de papaya bajo anegamiento93
5.3 RESULTADOS
5.3.1 Cuantificación de etileno foliar en dos genotipos de papaya bajo anegamiento94
5.3.2 Expresión del gen ACO en dos genotipos de papaya bajo estrés por anegamiento98
5.4 DISCUSIÓN
5.5 CONCLUSIONES103
CAPÍTULO VI105
6.1 DISCUSIÓN

6.2 CONCLUSIONES GENERALES	
6.3 PERSPECTIVAS	112
6.4 REFERENCIAS	113

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Partes de una planta de papaya. A) Hoja. B) Flores: masculina (M), hermafrodita (H)
y femenina (F). C) Fruto. D) Corte del fruto y semillas 4
Figura 1.2 Producción de papaya en México5
Figura 1.3 Mapa de Zona de Riesgo del estado de Yucatán, México, predicción del año 2080. 8
Figura 1.4 Diferentes niveles de anegamiento e inundación10
Figura 1.5 Modelo del censado de oxígeno en plantas11
Figura 1.6 Producción de ROS por los fotosistemas PSI y PSII en plantas bajo condiciones de estrés12
Figura 1.7 Vías canónica y no canónica de regulación de la respuesta de la planta al
anegamiento e inundación a través del etileno13
Figura 1.8 Representación del dominio AP214
Figura 1.9 Modelo propuesto del mecanismo de inducción de la respuesta ante hipoxia17
Figure 2.1 Temporal progression of morphological changes in wild papaya plants due to
prolonged waterlogging24
Figure 2.2 Number of leaves that remained on the plant A) and changes in the internal angle (of
the petioles with the main stem) B), in wild papaya plants subjected to prolonged
waterlogging stress25
Figure 2.3 Kinetics of Photosynthesis (Pn) A), Stomatal conductance (gs) B), Transpiration C)
and Photosynthetic efficiency (Fv/Fm) D), in wild papaya plants during prolonged
waterlogging stress
Figure 3.1 Schematic representation of the flooding system
Figure 3.2 Wild papaya plants and fruits35
Figure 3.3 Appearance of papaya plants of wild and Maradol genotypes, before they were
waterlogged (control plants) and when exposed to waterlogging treatment (for 0, 24, 48 and
72 h) and during the recovery process (for 24, 48 and 72 h)
Figure 3.4 Dissolved Oxygen (DO) concentrations in the water of control pots, and in the water
of the pots used to impose the waterlogging treatments to plants from wild and Maradol
genotypes (measured at 0, 24, 48 and 72 h)37
Figure 3.5 Fluorescence parameters: a maximum yield of PSII (Fv/Fm) and b Photosynthetic
Figure 3.5 Fluorescence parameters: a maximum yield of PSII (Fv/Fm) and b Photosynthetic potential index (Plabs) in both wild and Maradol papaya genotypes in control plants, and
Figure 3.5 Fluorescence parameters: a maximum yield of PSII (Fv/Fm) and b Photosynthetic potential index (Plabs) in both wild and Maradol papaya genotypes in control plants, and during waterlogging (for 0, 24, 48 and 72 h) and during the recovery stage (for 0, 24, 48

Figure 3.6 OJIP curves (fluorescence vs time, ms) of both Maradol and wild papaya genotypes.
Figure 3.7 Gas exchange parameters41
Figure 3.8 Electrolyte leakage (EL) in both wild and Maradol papaya genotypes in control and
waterlogged plants (at 0, 24, 48, and 72 h)42
Figure 3.9 Osmotic (Ψ s), Water (Ψ w), and hydrostatic pressure potential (Ψ p) potentials in a
Maradol and b wild papaya genotypes measured at 0, 24, 48 and 72 h43
Figure 3.10 Correlations between leaf water potential (Ψ_w) and various physiological
parameters45
Figure 3.11 Correlations between Dissolved Oxygen (DO) concentration and various
physiological parameters46
Figura 4.1 Tipos de estrés en los que se involucran los ERF-VII52
Figura. 4.2 Filogenia de los miembros de la familia ERF-VII
Figura 4.3 Reconstrucción filogenética de los genes pertenecientes a la superfamilia ERF de C.
рарауа66
Figura 4.4 Filogenia del subclado ERF-VII de las secuencias A. thaliana con sus respectivas
secuencias identificadas en <i>C. papaya.</i> 67
Figura 4.5 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de los ortólogos de ERF-
VII de <i>A. thaliana</i> y <i>C. papaya</i> 71
Figura 4.6 Motivos conservados en las secuencias de los FT ERF-VII de A. thaliana y C.
рарауа72
Figura 4.7 Estructura 3D de las proteínas RAP2.12, RAP2.3 y HRE2 de la familia ERF-VII de
A. thaliana y sus homólogos identificados en el genoma de C. papaya. S
Figura 4.8 ARNr del tejido de hoja y raíz de dos genotipos de papaya Maradol y silvestre de C.
papaya durante el estrés por anegamiento durante 0, 24, 48 y 72 h
Figura 4.9 Producto de amplificación de los genes EF1a, CpRAP2.12, CpRAP2.3 y CpHRE2
en los tejidos de hoja y raíz de los genotipos Maradol y Silvestre durante 0, 24, 48 y 72 h
en estrés por anegamiento77
Figura 4.10 Curva Melt y Curva estándar de concentración de los iniciadores de los genes
CpRAP2.12 (a, b), CpRAP2.3 (c, d) y CpHRE2 (e, f)79
Figura 4.11 Niveles de Expresión Relativa (REL) en hojas del gen CpRAP2.3 en C. papaya80
Figura 4.12 Niveles de Expresión Relativa (REL) de los genes a) CpRAP2.12, b) CpRAP2.3 y
c) CpHRE2 c) en raíces <i>C. papaya</i> genotipos Maradol y silvestre82
Figura 5.1 Ruta de biosíntesis de etileno en plantas90

Figura 5.2 Diagrama de los tratamientos del ensayo de anegamiento91
Figura 5.3 Caja de acrílico utilizada para capturar etileno92
Figura 5.4 Regresión lineal del área bajo la curva y la cantidad de µmoles (0.7, 1.4, 2.1, 2.8) de
etileno94
Figura 5.5 Cromatogramas unificados de las diferentes cantidades de etileno (µmoles)95
Figura 5.6 Cromatogramas de las muestras foliares de C. papaya bajo estrés por
anegamiento
Figura. 5.7 Cantidad de etileno (µmoles producidos por cm ⁻²) de área foliar de dos genotipos
de <i>C. papaya</i> , Maradol y silvestre97
Figura 5.8 Producto de amplificación del gen ACO98
Figura 5.9 Curva Melt y Curva estándar de los iniciadores del gen ACO99
Figura 5.10 Expresión Relativa del gen ACO en dos genotipos de plantas de papaya bajo
condiciones de anegamiento100
Figura 6.1 Esquema de la respuesta fisiológica y molecular del estrés por anegamiento en C.
<i>papaya</i> genotipo silvestre110

Figura 6.2 Esquema de la respuesta morfológica, fisiológica, de producción de etileno y expresión al alza del genotipo silvestre de C. papaya ante el estrés por anegamiento......111

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1 Características de los frutos obtenidos de plantas silvestres de C. papaya34
Tabla 4.1 Resultados del BLAST de las secuencias de A. thaliana de todos los Factores de
Transcripción ERF en el genoma C. papaya recuperados mediante HMMER58
Tabla 4.2 p-distancia entre las proteínas correspondientes de A. thaliana y las secuencias de
С. рарауа
Tabla 4.3 Matriz de identidad de las secuencias de A. thaliana respecto a las secuencias de C.
рарауа
Tabla 4.4 Parejas de iniciadores correspondientes a las secuencias de C. papaya74
Tabla 4.5 Cuantificación de ARN (ng μ L-1) y rendimiento de ARN por g de peso fresco (gPF)
extraído de diferentes tejidos en los genotipos Maradol y silvestre bajo diferentes tiempos
de anegamiento75

RESUMEN

El cambio climático, que incrementa la aparición de fenómenos meteorológicos como las inundaciones; aunado al aumento de la población y sumando la sensibilidad de las especies domesticadas a los diversos factores de estrés, han llevado a las investigaciones a prestar atención a los genotipos silvestres, conocidos por ser reservorios genéticos importantes para hacer frente a dichos desafíos. Por lo que, en este estudio se buscó comparar las respuestas fisiológicas, moleculares y bioquímicas entre un genotipo silvestre y uno comercial (Maradol) de la especie *Carica papaya* L. durante el estrés por anegamiento.

Nuestros resultados sugieren que, las plantas de papaya son sensibles al anegamiento prolongado (72 h). Sin embargo, las diferencias en la eficiencia fotosintética, fuga de electrolitos, conductancia estomática y fotosíntesis sugieren una respuesta más tolerante en el genotipo silvestre en comparación al genotipo Maradol, siendo que, según los análisis de correlación, dichas respuestas fisiológicas dependen más de la deficiencia de oxígeno en el agua que del cambio en el potencial hídrico del sustrato.

Por su parte, la identificación de los Factores de Transcripción de Respuesta a Etileno (ERF), arrojó la presencia de tres miembros de la subfamilia VII en el genoma de papaya, los cuales fueron evaluados en su expresión, por estar asociados a la respuesta al estrés por hipoxia. Los ensayos se realizaron en muestras de raíz de papayas inundadas de ambos genotipos, en donde, el gen CpRAP2.12 mostró mayor expresión en el genotipo silvestre, lo que puede estar ligado a la mejor respuesta ante el estrés por anegamiento. Asimismo, se evaluó la producción de etileno foliar, donde se identificó una mayor acumulación de etileno en el genotipo silvestre. Estos resultados se complementaron con el análisis del gen ACO (última enzima en la ruta de biosíntesis de etileno), donde, a las 72 h de anegamiento, el genotipo silvestre presentó niveles de expresión superiores a los del genotipo Maradol.

Con lo anterior, se llegó a la conclusión de que, a pesar de la sensibilidad de la papaya al estrés por anegamiento, los genotipos silvestres cuentan con estrategias fisiológicas de tolerancia. Esta respuesta posiblemente se relaciona con la acumulación de etileno y a la inducción de genes tipos ERF-VII. Por lo tanto, se consideran a estos genes como candidatos potenciales para el mejoramiento de variedades comerciales. Sin embargo, es pertinente realizar más estudios al respecto e identificar más candidatos en rutas no canónicas de respuesta a etileno en este estrés.

ABSTRACT

Climate change, which increases the occurrence of meteorological phenomena such as floods, together with population growth and the sensitivity of domesticated species to various stress factors, has led research to focus on wild genotypes, known for being important genetic reservoirs to face such challenges. Therefore, this study aimed to compare the physiological, molecular, and biochemical responses between a wild genotype and a commercial one (Maradol) of the species *Carica papaya* L. under waterlogging stress.

Our results suggest that papaya plants are sensitive to prolonged flooding (72 h). However, differences in photosynthetic efficiency, electrolyte leakage, stomatal conductance, and photosynthesis indicate a more tolerant response in the wild genotype compared to the Maradol genotype, and that these responses are more closely related to oxygen deficiency than to soil water potential.

On the other hand, the identification of Ethylene Response Factors (ERFs) revealed the presence of three members of subfamily VII in the papaya genome, which were evaluated for their expression due to their association with the response to hypoxia stress. The assays were conducted on root samples from flooded papayas of both genotypes, where the CpRAP2.12 gene showed higher expression in the wild genotype, which may be linked to a better response to flooding stress. Foliar ethylene production was also evaluated, showing greater ethylene accumulation in the wild genotype. These results were complemented by the analysis of the ACO gene (the last enzyme in the ethylene biosynthesis pathway), where, after 72 h of flooding, the wild genotype exhibited higher expression levels than the Maradol genotype.

Based on the above, it was concluded that despite papaya's sensitivity to waterlogging stress, wild genotypes possess physiological tolerance strategies. This response is possibly related to ethylene accumulation and the induction of ERF-VII-type genes. Therefore, these genes are considered potential candidates for the improvement of commercial varieties. However, further studies are needed to support this and to identify additional candidates involved in non-canonical ethylene response pathways under this stress.

INTRODUCCIÓN

La papaya (Carica papaya) es uno de los frutales de mayor distribución y consumo a nivel mundial. Debido a sus propiedades nutricionales y organolépticas es altamente apreciada por diversas industrias (Koul et al., 2022; Babalola et al., 2024). La papaya es una especie herbácea, cultivada en zonas tropicales, que se caracteriza por sus frutos de gran tamaño, color rojonaranja y que en su interior se encuentran semillas negruzcas cubiertas de mucílago. México se posiciona como el principal país exportador de este fruto a nivel internacional, generando ingresos de hasta 921 mil millones de pesos anuales (SIAP, 2025). Algunos de los estados en los que se concentra la producción son Oaxaca, Colima, Chiapas, Veracruz, Michoacán y Yucatán (SIAP, 2025). Este último estado se localiza en el centro de origen y distribución de esta especie, lo que permite encontrar, hasta la actualidad, ejemplares silvestres en zonas poco perturbadas a lo largo del estado (Fuentes y Santamaría, 2014; Espinosa-Trujillo et al., 2018). Estos genotipos se diferencian por sus frutos pequeños, generalmente de color amarillo, con pulpa escasa, mayormente conformado por semillas negras a café, de 3 mm de largo aproximadamente (Chávez-Pesqueira y Nuñez-Farfán, 2017; Flores-Hernández et al., 2024). Así mismo, otra característica importante de estos ejemplares es que se encuentran expuestos a condiciones climáticas extremas, pasando por periodos de seguía, altas temperaturas, lluvias torrenciales y huracanes a lo largo del año (Chávez-Pesqueira y Nuñez-Farfán, 2017). Estas condiciones extremas se han exacerbado debido al efecto del cambio climático (Eckardt et al., 2023). Las investigaciones en el estrés abiótico en papaya se han enfocado principalmente en altas temperaturas y sequía, sin embargo, las lluvias excesivas ocasionan el anegamiento de los campos de cultivo y generan la muerte de las plantas de papaya en cuestión de horas o pocos días (Thani et al., 2016). Tan solo, para el año 2024, se perdieron más de 120 ha de papaya Maradol en los estados de Yucatán y Campeche, como consecuencia de lluvias excesivas en el mes de junio (https://www.poresto.net/campeche/2024/9/9/papayeros-de-hopelchen-no-logranembargo, recuperarse-de-las-perdidas-que-dejaron-las-lluvias-de-julio-.html). Sin la supervivencia de genotipos silvestres de papaya al estrés abiótico, ha llamado la atención para su investigación, conformando una fuente de información relevante para comprender los mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés como la sequía y altas temperaturas (Estrella-Maldonado et al., 2021; Bautista-Bautista et al., 2024). Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado investigación en relación a la respuesta de genotipos silvestres de papaya hacia el estrés por anegamiento.

INTRODUCCIÓN

En otras especies vegetales, se ha reportado que la tolerancia hacia el anegamiento depende de la activación de Factores de Transcripción de Respuesta a Etileno de la subfamilia VII (ERF-VII por sus siglas en inglés) (Loreti y Perata, 2023; Bai et al., 2023). Estos ERF-VII inducen cambios metabólicos, fisiológicos y estructurales, que permiten a la planta permanecer por tiempos cortos o prolongados con deficiencia de oxígeno (Zubrycka et al., 2023). En el caso de la papaya, existen pocos estudios acerca de la respuesta ante este tipo estrés y contemplando la problemática en la que se encuentra actualmente, el objetivo de este trabajo fue analizar y comparar la respuesta al anegamiento de un genotipo comercial y uno silvestre de papaya, desde enfoques fisiológicos y de expresión de los genes ERF-VII. Con esto, se espera sumar información relevante a las estrategias de mejoramiento del cultivo, esperando mejorar la producción ante los efectos, cada vez más evidentes, del cambio climático que amenaza a muchos cultivos de importancia comercial.

ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de Carica papaya L.

1.1.1 Clasificación taxonómica y descripción de Carica papaya L.

El papayo o papaya (*C. papaya*) es una planta herbácea originaria de Mesoamérica, distribuyéndose desde el sur de México hacia Centroamérica, llegando hasta Brasil. De acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2022) se clasifica de la siguiente manera:

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Caricaceae
Género	Carica L.
Especie	Carica papaya

Es un árbol perenne de tallo carnoso, que puede medir de 2 a 3 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 30 cm. Posee hojas grandes, con peciolo largo (**Figura 1.1A**), formando una copa abierta y redondeada, donde las hojas superiores son erectas y las inferiores son colgantes (Jiménez et al., 2014). Las variedades comerciales poseen tres tipos de flores: masculinas, que se caracterizan por ser delgadas y largas, con tubos elongados y pétalos cortos; hermafroditas, con estambres situados al final de la corola y un pistilo que contiene un ovario alargado; y femeninas, con cáliz corto de cinco sépalos, además de cinco pétalos blanquecinos, con un pistilo que posee un ovario (**Figura 1.1B**) (Gil y Miranda, 2005; Alcántara-Jiménez et al., 2019). Los frutos, conocidos como papaya, son bayas de forma elipsoides u ovaladas, que al madurar son de color amarillo a anaranjado (**Figura 1.1C**) y se distribuyen alrededor del tronco.

Poseen pulpa blanda de color anaranjado a rojizo y en su centro se distribuyen pequeñas semillas ovoides, negruzcas, cubiertas por una capa mucilaginosa (**Figura 1.1D**).



Figura 1.1. Partes de una planta de papaya. A) Hoja. B) Flores: masculina (M), hermafrodita (H) y femenina (F). C) Fruto. D) Corte del fruto y semillas. Tomado y editado de Jiménez et al., 2014.

1.1.2 Producción en México

El principal productor de papaya es India por su alto número de hectáreas sembradas, sin embargo, su producción se destina a su mercado nacional (Sharma et al., 2024). Por su parte, México en 2023 abarcó el 53% de las exportaciones (FAO, 2024), considerándose como el principal exportador del mundo. Actualmente, la Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, estima que para el año 2030 la demanda de papaya a nivel internacional superará el millón de toneladas, por lo que se proyecta que México supere las 300 000 toneladas exportadas. Por todo lo anterior, se considera a la papaya como un producto económicamente relevante, tanto por ser una fuente del ingreso familiar, para pequeños productores, como por su participación en la captación de divisas en la economía nacional (Valencia-Sandoval et al., 2017). Los estados de mayor producción de papaya son Oaxaca, Chiapas, Colima, Veracruz, Michoacán y Guerrero (**Figura 1.2**), sin embargo, en junio de 2020, Yucatán presentó una producción de más de 8 mil toneladas de papaya (SIAP, 2025), lo que lo posiciona dentro de las regiones de importancia productiva y de alto potencial (Planeación Agrícola Nacional 2017-2030).



Figura 1.2. Producción de papaya en México. Elaboración propia, datos del SIAP (2025).

1.1.3 Requerimientos del cultivo de papaya

La papaya es una planta que se puede encontrar en zonas tropicales y subtropicales, creciendo desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm, aunque los mejores rendimientos se presentan entre los 30 y 600 msnm (Mejía-Calderón y Vides, 2018). Además, se desarrolla a temperaturas entre los 21 y 33°C, mientras que su actividad fotosintética se ve favorecida entre los 25 y 28°C (Kwok y Liang, 2019).

Son plantas tipo C_3 , que no tienen influencia marcada por el fotoperiodo, por lo que se consideran de día neutro (Oliva-Díaz et al., 2023). No obstante, requieren grandes cantidades de radiación solar para tener un buen desarrollo, principalmente para el fruto (Mejía-Calderón y Vides, 2018).

Sus requerimientos de agua anual oscilan alrededor de los 1800 mm anuales, siendo poco tolerantes a condiciones de sequía y muy sensibles al exceso de agua (Thani et al., 2016). Por lo anterior, requieren de suelos bien drenados, de preferencia franco-arenosos, y que posean un pH entre 5.6 y 7.0 (Oliva-Díaz et al., 2023). También se puede desarrollar en otras texturas,

mientras que sean profundos, con buena retención de agua y suficiente drenaje (Kwork y Liang, 2019).

1.1.4 Estrés hídrico en el cultivo de papaya

La disponibilidad del agua representa otro factor importante en el desarrollo de las plantas, por lo que su deficiencia o exceso suelen ser perjudiciales en la mayoría de los cultivos. Cuando una planta de papaya presenta niveles por debajo del 82% de contenido relativo de agua en sus hojas, se considera que presenta déficit hídrico (Oliva-Díaz et al., 2023). En estrés por sequía, el cierre de estomas produce una disminución de la asimilación del CO₂ y tasa fotosintética, esto limita el crecimiento, lo que provoca que el desarrollo de los frutos se vea severamente afectado (Girón-Ramírez, 2015). Este tipo de estrés puede reducir hasta en un 50% la producción de papaya (Estrella-Maldonado et al., 2021).

En cambio, el exceso de agua satura los poros de aire presentes en el suelo, lo que impide la disponibilidad de oxígeno, limitando la respiración de las raíces (Ben-Noah y Friedman, 2018). Esto se debe a que el oxígeno es un aceptor terminal de electrones en la respiración aeróbica, por lo tanto, en su ausencia, tanto el ciclo de Krebs como el sistema de transporte de electrones son bloqueados (Ashraf, 2012). De esta forma, las plantas buscan otras maneras de generar energía, como es activar rutas fermentativas, sin embargo, resulta en ser una ruta que aporta poca energía y que genera una gran cantidad de ácido láctico, la cual modifica el pH citosólico.

En el caso de la papaya, durante el anegamiento se interrumpe el intercambio de gases entre las raíces y la atmósfera lo que detiene el suministro de energía al resto de la planta, si este estado se prolonga por más de 48 h, como en el caso de las inundaciones, las plantas mueren (Thani et al., 2016).

1.1.5 El anegamiento como fenómeno edafoclimático

1.1.5.1 El cambio climático y el anegamiento

Se considera como cambio climático a las alteraciones significativas, a largo plazo, de las temperaturas y eventos climatológicos que se presentan en todo el mundo (United Nations, 2022). Se han registrado muchas consecuencias a raíz del cambio climático, como son el aumento de las temperaturas, la intensificación de las precipitaciones, apariciones más frecuentes de huracanes, ciclones, tormentas tropicales, sequías, incendios, inundaciones y

pérdida de la biodiversidad. Todos estos efectos interfieren directamente con la producción de alimentos en todo el planeta. Los rangos óptimos de crecimiento que los cultivos poseen se van modificando gradualmente con el paso del tiempo, sin embargo, estos cambios extremos están limitando la productividad de una gran cantidad de alimentos. En este sentido, el aumento en las temperaturas, las sequías y el exceso de agua, se consideran como las principales limitantes del crecimiento y producción de las plantaciones.

En los últimos 25 años, se registró un aumento de las inundaciones del 65% en todo el mundo (Lou et al., 2024). Esto debido al aumento en las lluvias extremas, la aparición recurrente de tormentas tropicales y huracanes, aumento del nivel del mar y otros, en su mayoría por consecuencia del cambio climático. Tan solo entre el 10 y 12% de las zonas agrícolas de todo el mundo están presentando problemas de inundación y anegamiento, lo que afecta directamente a la producción y, por supuesto, las ganancias (Tong et. al., 2021). Con esto, se consideran a las inundaciones y encharcamientos (anegamiento) como parte de los factores abióticos más limitantes de la producción de los cultivos en los últimos años.

En el estado de Yucatán, México, según el Mapa de Zona de Riesgo (Climate Central, 2022) se estima un aumento del nivel del mar, tan grave, que para el año 2080, algunos municipios se encuentren, por lo menos, 1.5 m debajo del nivel mar (**Figura 1.3**). A largo plazo, estas situaciones pondrán en peligro a cientos de habitantes de dichas zonas. Por el momento, las principales afectaciones se están registrando en las zonas productoras de algunos productos de gran importancia como son la papaya. La mayoría de éstos eventos se debe al aumento considerado de tormentas tropicales y huracanes provenientes del Océano Atlántico, Mar Caribe y Golfo de México.



Figura 1.3 Mapa de Zona de Riesgo del estado de Yucatán, México, predicción del año 2080. Cada punto azul representa el aumento de 1.5 m del nivel del mar. Tomado de Climate Central (https://ss2.climatecentral.org/#12/40.7298/-74.0070?show=satellite&projections=0-K14_RCP85-SLR&level=5&unit=feet&pois=hide)

1.1.5.2 Inundación y anegamiento en el suelo

En la mayoría de los sistemas de producción agrícola en México se depende de las lluvias como fuente principal de agua (Conagua, 2023), lo que deja a los sembradíos y parcelas vulnerable a cambios en los patrones de precipitación. Normalmente se asocia el régimen de temporal y el cambio climático, con la disminución de las precipitaciones, ocasiona estrés hídrico por falta de lluvias (Santa Cruz-Suárez et al., 2022). Como consecuencia, se genera la disminución del potencial hídrico en el suelo hasta niveles que causan un daño irreparable en la planta y la llevan a la muerte (Luna-Flores et. al., 2012).

Por otro lado, el extremo contrario también se ha registrado en diversos lugares, exceso de lluvias que conllevan a la inundación o anegamiento de los predios (Rupngam y Messiga, 2024). Un incremento inesperado en la cantidad de lluvia genera que la cantidad de agua que llega al suelo sea superior a su capacidad de conductividad hidráulica (Cristóbal-Muñoz et al., 2022) generando que los espacios físicos con aire se llenen de agua (Morales-Olmedo et al., 2015), se modifiquen las características físicas del suelo (Githui et al., 2022), lo cual, aunado a las modificaciones de la actividad microbiológica (Shah et al., 2022) acaban con el oxígeno del suelo. Además, esto modifica la temperatura del suelo e impacta fuertemente en el desarrollo radicular de las plantas (Huang et al., 2023).

Unger et al. (2009) demostraron que la inundación prolongada tiene efectos significativos sobre algunas propiedades físicas y químicas del suelo. En relación con las físicas, la inundación disminuye el potencial redox del suelo y el oxígeno disuelto en el mismo, lo que confirma su anoxia. Por otro lado, aunque la mayoría de las características químicas del suelo no se modifican por la inundación, conforme aumenta el tiempo de inundación, la disponibilidad de nitratos (NO₃) disminuye.

Sin embargo, las precipitaciones no son la única fuente de inundaciones y anegamientos que enfrentan los cultivos, ya que una mala planeación en el manejo del riego o bien un mal drenaje del suelo puede inundar la zona de plantación; asimismo, se puede ocasionar la inundación o anegamiento por el incremento del afluente de los ríos o mala planeación de la ubicación de la zona productiva (Manghwar et al., 2024).

1.1.5.3 Niveles de exceso de agua: inundación y anegamiento

Una vez que el exceso de agua satura el suelo, el nivel de agua sobre la superficie puede incrementar hasta alcanzar diferentes niveles de la parte área de las plantas, entonces se pueden clasificar de acuerdo a Striker (2012) **(Figura 1.4)** como:

- a) Anegamiento (waterlogging): El agua satura el suelo, sin embargo, se mantiene a nivel del mismo. Solamente las raíces se encuentran completamente sumergidas en el agua, y, por tanto, en condiciones de hipoxia.
- b) Inundación (flooding):
 - a. <u>Inundación parcial</u>: Todo el sistema radicular se encuentra bajo el agua, sin embargo, el agua está sobre el nivel del suelo, alcanzando diferentes niveles del tallo y de la parte aérea de la planta, permitiendo aún que las hojas más altas se encuentren expuestas al aire.
 - b. <u>Inundación total:</u> La totalidad de la planta se encuentra por debajo del nivel del agua. Esto ocasiona que no llegue aire a la planta por ninguno de sus órganos. Además, la turbidez del agua disminuye significativamente la luz que alcanza las hojas.





1.1.5.4 Proyecciones de riesgo de anegamientos e inundaciones en México

Como respuesta al cambio climático, diversos fenómenos meteorológicos se presentan con mayor periodicidad e intensidad, lo que representa un mayor nivel de precipitaciones de abundancia atípica que cause inundaciones en México (Zuñiga y Magaña, 2018; Nazarian et al., 2024). Sin embargo, los mapas de riesgo específicos sobre la inundación son escasos (Bonasia y Lucatello, 2019), aunque ya existen iniciativas que podrían apoyar a la planeación con relación a la inundación (<u>https://thinkhazard.org/en/report/162-mexico/UF</u>), estas generalmente se enfocan a los problemas de inundación en zonas urbanas y no agrícolas.

Al momento de la redacción de la presente tesis, no se tiene aún estimado el número de eventos ciclónicos y huracanes para el año 2025 en México, sin embargo, para el año 2024 se registraron 60 eventos, lo que superó los pronósticos del Sistema Meteorológico Nacional (https://smn.conagua.gob.mx/es/ciclones-tropicales/temporada-ciclones-tropicales-2024).

1.1.6 Respuesta vegetal ante el anegamiento

1.1.6.1 Censado de la disminución de oxígeno por la planta ante el anegamiento

El mecanismo por el cual la planta censa la cantidad de oxígeno se encuentra aún bajo estudio, sin embargo, los mecanismos básicos conservados a través de las plantas se han estudiado ya en numerosos modelos. El mecanismo se basa en la degradación de proteínas que contienen una cisteína (Cys) en la segunda posición del extremo N-terminal, tal como las proteínas ERF-VII, ruta conocida como N-Degradon (Giuntoli y Perata, 2018). Esta degradación se lleva a cabo mediante la oxidación de dicha Cys, lo cual se lleva a cabo a través del sistema enzimático de

las PLANT CYSTEINE OXIDASE (PCO) (White et al., 2020). En condiciones normales de oxígeno (normoxia) estas enzimas oxidan la Cys rápidamente, sin embargo, en condiciones de baja oxigenación (hipoxia o anoxia), estas enzimas detienen su actividad permitiendo que las proteínas ERF-VII no se degraden (Fagerstedt et al., 2024; Yan et al., 2024). Por lo tanto, se considera que las PCO fungen como el mecanismo de censado de oxígeno en las plantas (Taylor-Kearney et al., 2022). Este modelo se ilustra en la **Figura 1.5.**



Figura 1.5 Modelo del censado de oxígeno en plantas. Tomado de Fagerstedt et al. (2024).

1.1.6.2 Sobreproducción de ROS por el anegamiento

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas químicas con una alta capacidad de reaccionar con otras moléculas, generando una fuerte oxidación (Choudhury et al., 2017). Las principales ROS que se conocen son el oxígeno singulete, el ión superóxido y el peróxido de

hidrógeno (Choudhury et al., 2017), entre otras. Estas moléculas juegan importantes roles en diferentes funciones de la planta, siendo de especial importancia como parte de la respuesta a fuentes de estrés abiótico (Huang et al., 2019).

Las plantas, bajo estrés abiótico, sobre producen ROS en el cloroplasto, específicamente en la cadena transportadora de electrones de los fotosistemas I y II (**Figura 1.6**), a través de la reacción de Mehler (Sachdev et al., 2021). En el caso específico del estrés por hipoxia provocada por inundación o anegamiento se ha reportado la sobreacumulación del radical superóxido y de peróxido de hidrógeno como respuesta a la deficiencia de oxígeno (Huang et al., 2019).



Figura 1.6 Producción de ROS por los fotosistemas PSI y PSII en plantas bajo condiciones de estrés. Tomado de Sachdev et al. (2021).

1.1.6.3 Acumulación de etileno en respuesta al anegamiento

La acumulación de ROS induce la activación de cascadas de señalización basada en MAPcinasas (MAPK) (Son et al., 2011), las cuales, a su vez, inducen la señalización necesaria para inducir la biosíntesis de etileno (Ouaked et al., 2003; Fatma et al., 2022). Por ejemplo, se ha identificado que en *A. thaliana,* el gen MKK9 media la síntesis de etileno mediante la activación de otras dos MAPK, MPK3 y MPK6 (Xu et al., 2008). Sin embargo, el proceso completo por el que la activación de la biosíntesis de etileno se lleva a cabo aún no se comprende por completo.

La biosíntesis del etileno se inicia desde su precursor que es el aminoácido s-adenosil-Lmetionina, el cual, por acción de dos enzimas (ACC sintasa y ACC oxidasa) da como resultado el etileno C_2H_4 (Pattyn et al., 2021), este proceso se detalla en el capítulo 3. Además de esta ruta, el ciclo de Yang es esencial para el mantenimiento de la producción de etileno (Pattyn et al., 2021).

Es importante destacar que, una respuesta fisiológica previamente descrita en plantas bajo estrés por inundación o anegamiento es el cierre de estomas, lo que inhibe el intercambio gaseoso y permite la acumulación de etileno (Rodríguez-Gamir et al., 2011; Maric y Hartman, 2022). La acumulación de etileno modifica la traducción proteica global de la planta e induce la expresión de genes específicos para la inducción de tolerancia hacia la inundación o anegamiento mediante la expresión del gen GENERAL CONTROL NONDEREPRESSIBLE 2 (GCN2) (Cho et al., 2022). A su vez, el etileno modifica la expresión de los genes ETHYLENE INSENSITIVE (EIN), los cuales inducen la expresión de genes de respuesta a hipoxia (Chen et al., 2022). Maric y Hartman (2022) proponen que el etileno regula la respuesta a la inundación mediante dos vías: 1) canónica (mediante genes EIN) y 2) no canónica (mediante GCN2); esto a tres niveles: transcripcional, traduccional y postraduccional, las cuales se resumen en la **Figura 1.7**.



Figura 1.7 Vía canónica y no canónica de regulación de la respuesta de la planta a la inundación a través del etileno. Tomado de Maric y Hartman (2022).

La respuesta canónica del etileno a través de los genes EIN induce la expresión de genes específicos, como los ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS (ERF), los cuales se describen a continuación.

1.1.7 Factores de Transcripción de respuesta a etileno (ERF)

1.1.7.1 Generalidades

Estos Factores de Transcripción (FT) se caracterizan por la presencia de un dominio APETALA2 y, por tanto, pertenecen a la familia AP2 (Müller y Munné-Bosch, 2015). El dominio característico de esta familia, el AP2/ERF, consiste en una secuencia de entre 60 a 70 aa y contiene tres β -láminas y una α -hélice (Zhai et al., 2022) (**Figura 1.8**). La familia de FT ERF se compone de al menos 12 grupos (Licausi et al., 2013).



Figura 1.8 Representación del dominio AP2. Estructuras 3D de a) AmCBF1, b) AmCBF2 y c) AmCBF3; d) alineamiento de las secuencias e identificación de las β -plegadas (β 1, β 2 y β 3) y la α -hélice. Tomado de Zhari et al. (2022).

La familia de FT ERF están ampliamente asociados a diversos procesos fisiológicos de las plantas, entre ellos, el crecimiento, desarrollo, maduración y respuesta al estrés abiótico (Zhai et al., 2022; Licausi et al., 2013). En este último aspecto, los FT ERF se han mostrado esenciales en el diseño de estrategias de control del estrés abiótico (Zhang et al., 2022; Nie y Wang, 2023).

Por ejemplo, se ha reportado que el gen OsERF52 regula la respuesta del arroz (*Oryza sativa*) al estrés por frío, por lo cual, al incrementar su expresión se mejora la tolerancia al frío sin

impactar en su rendimiento y calidad (Xu et al., 2024). Asimismo, se ha demostrado experimentalmente que la sobre expresión del gen VvERF63 de la vid (*Vitis vinífera*) incrementa la tolerancia de este cultivo. Así mismo, en *A. thaliana*, este gen aumentó la tolerancia al frío mediante el incremento la capacidad fotosintética, mejoró la estabilidad de la membrana e indujo la actividad enzimática antioxidante (Li et al., 2023). Por otro lado, la expresión heteróloga del gen MbERF11 de manzana (*Malus baccata*) induce una alta tolerancia al frío y la salinidad en *A. thaliana*, lo cual se relaciona con una mayor actividad antioxidante y ajuste osmótico (Han et al., 2020).

Otros ejemplos del papel de FT ERF en la inducción de tolerancia al estrés abiótico son el gen PtoERF15, el cual al sobre expresarse induce tolerancia a la sequía en *Populus* mediante la estabilización del potencial hídrico de la planta (Kong et al., 2023). El gen GmABR1, perteneciente a la familia ERF, de la soya (*Glycine max*) induce tolerancia al estrés por exceso de aluminio en *A. thaliana* (Wang et al., 2023). Aunado a lo anterior, estudios genómicos han demostrado la presencia y participación de genes ERF en yuca (*Manihot esculenta*) (Fan et al., 2016).

1.1.7.2 Subfamilia ERF-VII y su relación con el estrés por anegamiento

La subfamilia ERF-VII de los FT ha sido ampliamente asociada con la respuesta de las plantas a la falta de oxígeno, especialmente por diferentes niveles de inundación (Giuntoli y Perata, 2018). Se ha observado que la falta de oxígeno permite la estabilización de los ERF-VII a través de los genes PCO, tras lo cual, las proteínas codificadas por los genes se traslocan al núcleo e inducen la expresión de genes de respuesta a hipoxia (HRG) (Loreti y Perata, 2023).

En *A. thaliana* se han identificado cinco genes ERF-VII: tres miembros conocidos como RELATED TO AP2 (RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12) y dos HYPOXIA RESPONSIVE ERF (HRE1, HRE2) (Giuntoli y Perata, 2018). Se ha documentado previamente que la actividad de los genes de la subfamilia ERF-VII, por ejemplo:

- La sobre expresión del gen AvERF75 (homólogo a RAP2.3) mejora significativamente la tolerancia al estrés por inundación en kiwi (*Actinidia valvata*), mediante la interacción con el gen AvLOB41 (Bai et al., 2023).
- Los genes AtRAP2.2, AtRAP2.3 y AtRAP2.12 tiene funciones redundantes en la respuesta a la hipoxia por inundación en *A. thaliana* (Bui et al., 2015).

- El gen ZmEREB180, una variante específica de la subfamilia ERF-VII de maíz, regula positivamente la tolerancia a la inundación en esta gramínea (Yu et al., 2019).
- La sobre expresión del gen HvERF2.11 de la cebada (*Hordeum vulgare*), un miembro de la sub familia ERF-VII incrementa la tolerancia a la sequía en *A. thaliana* (Luan et al., 2020).
- El gen MaERFVII₃, de plátano (*Musa acuminata*), al ser sobre expresado en *A. thaliana* incrementa significativamente su tolerancia a la inundación (Teoh et al., 2024).

Cada día es más abundante la evidencia que demuestra que el grupo ERF-VII tiene un papel fundamental en la respuesta de la planta ante la hipoxia causada por inundación.

Hartman y colaboradores (2019), propusieron un modelo secuencial de la inducción de la respuesta ante hipoxia (**Figura 1.9**):

- Acumulación de etileno después de unos minutos de inundación, intercambio gaseoso restringido.
- II. Percepción de etileno e inducción de la señalización de EIN2 y EIN3.
- III. Producción de PGB1, un eliminador de NO (óxido nítrico), en la primera hora de estrés.
- IV. En las primeras horas, PGB1 agota el NO.
- V. La ausencia de NO inactiva PRT6, cuya presencia inactiva los ERF-VII. Por consecuencia, inducción de la activación de ERF-VII.
- VI. Estabilización de los ERF-VII, transferencia al núcleo y, en ausencia de O₂, inducción de la expresión de genes en respuesta a la hipoxia.



Figura 1.9 Modelo propuesto del mecanismo de inducción de la respuesta ante hipoxia. Tomado de Hartman et al., 2019.

1.1.7.3 Identificación y función de genes ERF en C. papaya

La secuenciación y anotación del genoma de *C. papaya*, así como otros estudios de secuenciación masiva han permitido ahondar en el conocimiento de la presencia de la familia ERF en este frutal. Por ejemplo, un estudio basado en microarreglos permitió identificar que el gen CpERF2 está estrechamente ligado con la maduración del fruto (Fabi et al., 2012). Por su parte, Estrella-Maldonado et al., (2021) observaron que algunos genes de esta familia incrementan su expresión al paso del tiempo en que la planta se encuentra en estrés por sequía, además, estos genes muestran mayor expresión en un genotipo silvestre de *C. papaya*.

Además, se identificaron cuatro miembros de la familia CpERF (CpERF5-CpERF8), de los cuales, se demostró que los genes CpERF5, CpERF6 y CpERF8 se expresan principalmente en el estado vegetativo de la planta y en tejido reproductivo, mientras que el gen CpERF7 tiene una función asociada con la respuesta a fitopatógenos (Vallejo-Reyna et al., 2015). Más recientemente, se identificó al clado SHINE de la familia ERF en *C. papaya*, el cual tiene un número reducido de miembros de este clado respecto a *A. thaliana*, además, se identificó que la expresión de dos de sus miembros, CpSHN1 y CpSHN2 está positivamente correlacionada a la
CAPÍTULO I

deposición de ceras y la tolerancia al estrés hídrico, especialmente en un genotipo silvestre (Girón-Ramírez et al., 2021).

Con base en lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar el papel de los genes CpERF-VII en dos genotipos de *C. papaya* al enfrentarse a estrés por anegamiento. Para lo anterior, se han plasmado cuatro capítulos: el Capítulo II consiste en el estudio de la respuesta fisiológica del genotipo silvestre ante el anegamiento. Por su parte, el Capítulo III está basado en la comparación de la respuesta fisiológica al estrés por anegamiento de los genotipos silvestre contra el comercial (Maradol). El Capítulo IV se enfocó en la búsqueda de miembros de la subfamilia ERF-VII en el genoma de *C. papaya*, su caracterización molecular y su expresión durante el estrés por anegamiento en ambos genotipos. Por último, en el capítulo V se realizó la detección y cuantificación de etileno foliar en los dos genotipos de papaya, así como la expresión de la enzima responsable del último paso de su biosíntesis en ambos genotipos de papaya en anegamiento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias fisiológicas y moleculares, relacionadas a los ERF-VII, en la respuesta al anegamiento entre los genotipos Maradol y silvestre de *Carica papaya*?

HIPÓTESIS

El genotipo Silvestre de *C. papaya* posee una respuesta fisiológica y molecular diferencial en respuesta al estrés por anegamiento comparada con el genotipo Maradol, la cual se encuentra relacionada a los Factores de Transcripción tipo ERF-VII.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta fisiológica y molecular, basada en la expresión de genes CpERF-VII, ante el estrés por anegamiento en dos genotipos de *C. papaya*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Caracterizar la respuesta fisiológica ante el estrés por anegamiento en un genotipo silvestre y uno comercial de *C. papaya.*
- 2. Identificar y caracterizar *in silico* Factores de Transcripción ERF-VII en el genoma de *C. papaya in silico* y determinar su expresión relativa ante el estrés por anegamiento en dos genotipos de *C. papaya*.
- 3. Cuantificar la biosíntesis de etileno foliar en dos genotipos de *C. papaya* ante el estrés por anegamiento.

ESTRATEGA EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos anteriormente descritos, el presente trabajo se dividió en cuatro capítulos experimentales, detallados a continuación:



CAPÍTULO II

PHYSIOLOGY OF PROLONGED WATERLOGGING STRESS IN SEEDLINGS FROM WILD CARICA PAPAYA L. PLANTS COLLECTED AT YUCATAN, MEXICO.

Publicado como artículo científico:

González-Oviedo N.A., Fuentes-Ortíz G., Santamaría J.M. 2025. Physiology of prolonged waterlogging stress in seedlings from wild *Carica papaya* L. plants collected at Yucatan, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 28: e025. <u>http://doi.org/10.56369/tsaes.5281</u>

2.1 INTRODUCTION

Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most important fruit crops in Mexico, as the country is a leading global exporter. While the state of Yucatán is not among the main producers of this tropical crop, contributing only around 1% of the national production (SIAP, 2023), its significance lies in being part of the center of origin and distribution of this species (Chávez-Pesqueira and Nuñez-Farfán, 2017). Therefore, various wild populations of *C. papaya* have been identified in non-perturbed remote sites of Yucatán (Fuentes and Santamaría, 2013). This source of genetic reservoir is highly valuable when considering the improvement of cultivated varieties, whether through traditional breeding or biotechnology (Dhekney et al., 2016). For instance, previous studies have demonstrated that wild papaya populations identified in Yucatán are an important source of genetic material for drought tolerance (Estrella-Maldonado et al., 2021; Girón-Ramírez et al., 2021).

However, drought is not the only environmental challenge facing papaya production in the country and the state of Yucatán. Recent reports suggest that global climate change is causing atypical extreme rainfall in the state (Bautista-Zuñiga and Aguilar-Duarte, 2021), posing the risk of waterlogging in production areas. There are already reports suggesting that these changes in precipitation patterns could affect yields in other crops in the Yucatán Peninsula (Mardero et al., 2018).

Previous reports have demonstrated that the Maradol papaya cultivar is highly susceptible to flooding, experiencing irreparable damage to the plants after only 24 hours of waterlogging (Thani et al., 2016). However, it has been observed in other species that genotypes exhibiting drought tolerance may also show tolerance to flooding (Chen et al., 2023).

Therefore, the aim of the present study was to characterize the physiological response to prolonged waterlogging stress of seedlings derived from wild papayas collected at Yucatán, México.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Plant material

Seeds were obtained from fruits collected from a wild papaya population located on the Federal Highway Cancun-Merida, kilometer 75 (20.9° N, 89.2° W). Fruits were collected in July 2022. Subsequently, the fruits were placed in dark chambers with absorbent paper to favor ripening, for a period of 5 to 8 days, depending on the individual needs of each fruit. Furthermore, measurements of the equatorial and longitudinal diameter were taken using a digital caliper, and the weight of both the fruit and seeds was measured using an analytical balance. The seeds underwent a pre-germination treatment, which was achieved with a lab's protocol. Once germinated, the seeds were placed in a germination tray with sterile substrate until the seedlings reached 60 days of age. After reaching this stage, they were transplanted into black polyethylene bags filled with sterile substrate (peat moss + agrolite: 1:1).

2.2.2 Waterlogging treatments

60-day-old plants were placed in black bags and left under the waterlogging treatment, bags containing the plants were placed inside larger 10 L plastic pots without drainage holes, allowing water to completely inundate the root system. These pots were filled with 6 L of purified water, ensuring that the entire root system (100%) was submerged. The treatments consisted in subjecting the papaya plants to 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days under waterlogging conditions. Physiological parameters were measured each day.

2.2.3 Evaluation of morphological variables

A photographic record was taken every 24 hours to visualize any morphological changes caused by waterlogging. Additionally, leaf loss and petioles binding were monitored. The number of leaves remaining after subjecting plants to waterlogging stress were counted daily during the 7d waterlogging period. Similarly, the angle formed between the petioles and the main stem was measured using an angle protractor daily during the 7 d waterlogging period.

2.2.4 Experimental design

A completely randomized experimental design with two treatments (waterlogging and control) and three replicates was employed. Measurements were taken at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 d following the waterlogging. The data were analyzed using a two-tailed Student's t-test (p < 0.05) performed with R statistical software version 2.12.2. SigmaPlot 11 software was used to generate the graphs.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1. Effect of waterlogging on plant Morphology

Wild papaya plants exhibited progressive morphological changes over the seven days of waterlogging. During the initial three d of waterlogging, no significant signs of turgor loss or changes in petiole angles were observed (**Figure 2.1A-D**). However, starting from the fourth day, the morphological changes became more evident (**Figure 2.1E**). After 6 days under waterlogging treatment, petiole binding and leaf loss became more evident and after 7 days of waterlogging, only the upper leaves remained attached to the plant. This response differs from cultivated papaya genotypes, as there are reports that cultivated papayas begin to show severe structural damage after only 24 h of being waterlogged (Rodriguez et al., 2014).

Leaf loss data indicates that defoliation begins after 3 d of waterlogging, remaining relatively stable until the fifth day; however, wild papaya plants still maintain two leaves even after being waterlogged for 7 days (**Figure 2.1** and **Figure 2.2A**). These leaves might be the support to generate more leaves during a recovery period.

In terms of petiole binding (epinasty), plantlets showed variation in petiole angles after 24 hours of being waterlogged (**Figure 2.2B, C**). The lower leaves (leaves A, B and C in **Figure 2.2D**) showed decreased angles over the waterlogging treatment, only after seven days under this treatment. However, in upper leaves (D and E leaves), the angle increased as waterlogging stress progressed (**Figure 2.2C**). This variation in petiole angle has been associated with a rapid accumulation of intracellular ethylene (Iqbal et al., 2017), which, in turn, could be linked to a plant response to hypoxia stress caused by waterlogging (Khan *et al.,* 2020).

CAPÍTULO II



Figure 2.1 Temporal progression of morphological changes in wild papaya plants due to prolonged waterlogging: 0 days A), 1 day B), 2 days C), 3 days D), 4 days E), 5 days F), 6 days G) and 7 days H) under waterlogging treatment.

2.3.2 Effect of waterlogging on gas exchange parameters

The analysis of physiological response of wild papaya plants revealed that most variables (except Fv/Fm) decreased in different levels between days one and two, persisting throughout the experiment. The decline in stomatal conductance (**Figure 2.3B**) and transpiration (**Figure 2.3C**) from day one of waterlogging may be attributed to the plant's tendency to close its stomata to accumulate more oxygen, explaining the decrease in transpiration as reported for other plant

species under waterlogging stress (Yordanova *et al.,* 2005; Khayrul *et al.,* 2019), irrespective of their level of tolerance to this stress.



Figure 2.2 Number of leaves that remained on the plant A) and changes in the internal angle (of the petioles with the main stem) B), in wild papaya plants subjected to prolonged waterlogging stress. The leaf positions for analysis are depicted in C). Bars in each point are means \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences (p< 0.05).

The decrease in Pn (**Figure 2.3A**) and transpiration (**Figure 2.3D**) was less drastic than that occurring in stomatal conductance (**Figure 2.3B**), as it was after three days that Pn and transpiration reached 0 values. Thus, stomatal conductance was more sensitive to waterlogging as gs values reached 0 after only two days of being exposed to waterlogging stress. In fact, the reduction in photosynthesis has been suggested as being a common feature in plants under waterlogging stress, associated with stomatal closure and damage to PSII, due to photoinhibition (Sharma *et al.,* 2022).



Figure 2.3 Kinetics of Photosynthesis (Pn) A), Stomatal conductance (gs) B), Transpiration C) and Photosynthetic efficiency (Fv/Fm) D), in wild papaya plants during prolonged waterlogging stress. Bars in each point are means ± SD. Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05).

2.3.3. Effect of waterlogging on the Chlorophyll a fluorescence parameter Fv/Fm

On the contrary, photosynthetic efficiency (Fv/Fm) only decreased from values around 0.8 at day 0 in unstressed wild papaya plants, to values of 0.78 even after 7 days of waterlogging stress (**Figure 2.3D**). This is interesting as there are reports from commercial papaya cultivars such as Red Lady, where Fv/Fm values reached values as low as 0.4 after 24 h of waterlogging (even when they have removed plants from waterlogging, that is during the "recovery" stage) (Thani et

al., 2016). Other stress factors such as heat may also decrease Fv/Fm to values as low as 0.4 in other species like beans (González-Moreno *et al.,* 2008).

In the present study, Fv/Fm values from wild papaya plantlets did not decline below 0.78 even after 7 d of being waterlogged, suggesting that the damage to the photosynthetic mechanism might be reversible, given appropriate conditions for recovery as suggested by Sharma et al., (2022). In fact, recently, Fv/Fm has been suggested as a sound parameter to compare drought tolerance among plant genotypes (Rico-Cambron et al., 2023), and although clearly more research is needed, our results might suggest that Fv/Fm might also be used as an estimate of waterlogging tolerance.

2.4 CONCLUSIONS

Wild papaya seedlings exhibited morphological changes (petiole binding and leaf loss) under waterlogging stress. However, those morphological changes became apparent only after three days of being waterlogged. The petioles binding (epinasty) could be associated with ethylene accumulation. Waterlogged wild papaya seedlings suffered defoliation after being waterlogged for more than 3 days, but they still retained leaves even after 7 days of waterlogging. Other physiological parameters such as photosynthesis, conductance and transpiration decreased during the first 24 h after being waterlogged.

On the other hand, the chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm, showed only a slight reduction after 24 hours of being waterlogged. Even after 7 days of being subjected to waterlogging stress, wild papayas were capable of still maintaining high photosynthetic efficiency (Fv/Fm) values, that suggests that photosynthetic apparatus might not have been severely damage and it may recover once the waterlogging stress may be reliesed.

CAPÍTULO III

WILD CARICA PAPAYA GENOTYPE IS MORE WATERLOGGING RESILIENT THAN ITS COMMERCIAL COUNTERPART

Parte del Capítulo publicado como artículo científico:

González-Oviedo N.A., Fuentes-Ortíz G., Santamaría J.M. 2025. Wild *Carica papaya* genotype is more waterlogging resilient than its commercial counterpart. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 37: e13. <u>https://doi.org/10.1007/s40626-024-00361-0</u>

3.1 INTRODUCTION

Commercial papaya (*C. papaya* L.) cultivars are susceptible to various disturbances, both biotic (Tan et al. 2023) and abiotic (Gamboa-Tuz et al. 2018; Estrella-Maldonado et al. 2021; Arroyo-Alvarez et al. 2023; Bautista-Bautista et al. 2024). Regarding abiotic disturbance, studies in papaya have focused on the physiological alterations in response to high temperatures (Okereke et al. 2022; Bautista-Bautista et al. 2024), drought (Giron-Ramirez et al. 2021; Arroyo-Alvarez et al. 2023; Bautista-Bautista et al. 2024), cold (Chen et al. 2020), and salinity (Refahi and Shahsavar 2017). However, no reports exist on the physiological effects of waterlogging on papaya, although this disturbance may cause important economic losses (Tian et al. 2021).

Because of climate change, the frequency of tropical storms, cyclones, and hurricanes has increased by 65% in the last 25 years (Sharma and Manjeet 2020; Bundy et al. 2023), resulting in a higher incidence of waterlogged areas in tropical papaya-producing regions, including Yucatan (Bautista-Zuniga and Aguilar-Duarte 2021).

Waterlogging stress in plants occurs when all roots are covered by water but only a reduced area of the shoot is under water for a period. Waterlogging impose a challenging condition for plants due to the associated oxygen deficiency within the rhizosphere zone (Fukao et al. 2019). The lack of available oxygen leads to a hypoxic condition in the roots, triggering numerous molecular, metabolic, and physiological changes in the whole plant (Lothier et al. 2020; Habibi et al. 2023). Prolonged waterlogging has severe consequences in plants such as reductions in growth, yield, and ultimately, it may cause plant death (Loreti and Perata 2020). Waterlogging-adapted plants, however, exhibit physiological responses, such as a reduction in stomatal conductance and

photosynthetic rate, as well as changes in the production of plant hormones such as ethylene (Bhusal et al. 2020). Morphological modifications may also occur to optimize O₂ diffusion in the root zone, through the generation of adventitious roots or specialized tissues such as aerenchyma (Bailey-Serres et al. 2012).

Wild plants are frequently exposed to extreme environmental conditions, and they may have developed survival responses to cope with various types of environmental disturbances, making them an important genetic source for plant improvement (Renzi et al. 2022; Tirnaz et al. 2022). This is consistent with previous studies in *C. papaya*, where papaya plants from wild populations (collected at remote sites in Yucatan, Mexico; Fuentes and Santamaria 2014), have showed better responses to drought (Estrella- Maldonado et al. 2021; Giron-Ramirez et al. 2021), and heat (Bautista-Bautista et al. 2024) than the commercial cultivars, suggesting greater tolerance to those abiotic disturbances. However, it is not known how *C. papaya* genotypes would respond to waterlogging, nor is it known whether wild papayas might have developed physiological adaptations for dealing with prolonged periods of waterlogging, making them more tolerant, as it occurs for other abiotic conditions.

Here we characterized and compared the physiological response to waterlogging of two papaya genotypes (wild and commercial), to evaluate if the wild native genotype (collected at its center of origin) is more resilient to waterlogging than its commercial counterpart.

3.2 MATERIALS Y METHODS

3.2.1 Plant material and growth conditions

Two *C. papaya* genotypes were employed, a commercial Maradol cultivar and a wild genotype (collected at unperturbed areas of Yucatan; 20.9° N, 89.2° W, 14 m above sea level). Seeds from both genotypes were germinated and seedlings were transplanted into polystyrene bags filled with 1 kg of substrate (peat moss and perlite 1:1 v/v) and they were maintained in a greenhouse at the Yucatan Scientific Research Center, under semi-controlled conditions (27 \pm 2 °C, 70% relative humidity, natural light, and natural photoperiod).

3.2.2 Experimental design

3.2.2.1 Waterlogging treatment

The experiment was performed under greenhouse semi-control conditions (temperature 27 ± 2 °C, 70% relative humidity and natural light). The waterlogging system consisted of two potting systems, the first internal pot consisted of plastic black nursery bags (fitted with six bottom holes) containing substrate and young (ninety-day-old) papaya plants. A second external pot (a 10 L rigid plastic blue pot, with no drainage) was used to impose the waterlogging treatment (**Figure 3.1**). The plastic bag containing substrate and the plant was placed inside the larger blue pot, and 6 L of purified water were then added, covering 100% of the root system of the plants, but maintaining the aerial parts not submerged under water. Parameters were measured and samples were taken from both waterlogged and control plants from both genotypes (Maradol and wild) at 0, 24, 48 and 72 h after plants were exposed to waterlogging treatment. For each sampling time, five replicates were used for the non-destructive parameters and three replicates for destructive ones.



Figure 3.1 Schematic representation of the waterlogging system. Container 1 corresponds to a black bag holding the papaya plant. Container 2 is a plastic pot without drainage holes, used to retain water during the waterlogging treatment. Measurements of dissolved oxygen were performed using specialized sensors. Created in BioRender.com

3.2.2.2. Recovery process

Once plants were exposed to waterlogging for 72 h, the black plastic bags containing the wet substrate and plants were removed from the blue pot (containing the water used to impose the waterlogging treatment), and they were placed on a nursery bench allowing draining from the bottom holes (1 cm diameter perforations) under natural gravity conditions. Data were then collected 24, 48 and 72 h during this drainage period (recovery process). Control plants were maintained with the same substrate, in identical black plastic nursery bags (fitted with 6 bottom holes), as those plants exposed to the waterlogging treatment, but they were watered with 250 mL purified water every 2 days, during the whole duration (144 h) of the experiment (i.e. during the equivalent 72 h that lasted the waterlogging in the treatment group, and during the equivalent time that lasted the subsequent 72 h of the recovery period in the treatment counterparts).

3.2.3 Physiological Parameters

3.2.3.1 Fluorescence parameters and OJIP curves

Measurements were taken between 8:00 and 9:00 h with a Multi-function, Plant Efficiency Analyzer (MPEA) chlorophyll fluorometer (FMS 2; Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). The MPEA was used to measure maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm), the photosynthetic efficiency (Plabs), and to generate the OJIP curves. The setting conditions were: 20 min in darkness, followed by a saturation pulse of 3000 μ mol m⁻² s⁻¹ (70%) for 1 s. These variables were measured in intermediate, fully expanded leaves of both control and treatment plants for each genotype, at each measuring time point.

3.2.3.2 Gas exchange parameters

Photosynthesis (Pn), stomatal conductance (g_s), intercellular CO₂ (Ci), and transpiration (E) were measured between 8:00 and 9:00 h using a portable photosynthesis system (LI-COR LI-6400XT Inc., Lincoln, Nebraska, USA). The equipment was fitted with a 6 cm² area chamber window and it was set to a block temperature of 25 °C, an airflow of 400 µmol s⁻¹, and a flux density of 1000 µmol m⁻² s⁻¹. These variables were measured in intermediate, fully expanded leaves of both control and treatment plants for each genotype, at each measuring time point.

3.2.3.3 Electrolyte leakage (EL)

Five disks with a diameter of 2.5 mm were taken from the middle third of plant leaves, and they were placed into petri dishes containing 20 mL of deionized water. They were incubated for an hour under those conditions, and their initial conductivity (C1) was measured. Subsequently, the petri dishes were sterilized (121 °C, 15 psi) and a second conductivity measurement was then taken (C2). The data obtained were used to calculate electrolyte leakage as a percentage, using the following formula:

$$\% EL = \left(\frac{C1}{C2}\right) \times 100$$

3.2.3.4 Water relations

Leaf water potential (Ψ_w) was determined using a dew point hygrometer, WP4C (DewPoint Potential Meter). Additionally, the osmotic potential (Ψ_s), of the same leaves was measured using a vapor pressure osmometer (Vapro-5600, Wescor, Logan, UT, USA). Both sets of data were used to calculate the hydrostatic pressure potential (Ψ_p), using the following formula:

$$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$$

3.2.3.5 Dissolved oxygen

Dissolved Oxygen (DO) measurements were taken using a Pro20 (YSI, Yellow Springs, OH, USA) equipment from the purified water from the blue pot used for imposing the waterlogging treatment, during the waterlogging stage (0, 24, 48 and 72 h), and in purified water from a blue pot without plants, that was used as a control (0, 24, 48 and 72 h).

3.2.3.6 Data analysis

A completely randomized experimental design with two treatments (waterlogging and control) was used for both genotypes (Maradol and wild), with five replicates (in some destructive parameters only 3 replicates were used), a one-way Analysis of variance (ANOVA) was employed to assess the differences among waterlogging treatments, genotypes, as well as over time, using R software (version 2.12.2). To determine if the variation in the physiological parameters was correlated with Ψ_w or with DO, each fluorescence and gas exchange parameter was correlated with the corresponding Ψ_w or DO values using linear and polynomial regression tests, calculating the

coefficient of determination (R^2) and the significance (p< 0.05). The regression analyses were performed with the PAST 3.0 software. Twelve points are shown for each genotype in these correlation plots, resulting from measurements made on three replicates at 0, 24, 48 and 72 h of waterlogging.

3.3 RESULTS

3.3.1 Collection and Characterization of Wild C. papaya Fruits

The collection of wild *C. papaya* individuals was carried out in areas with native vegetation and minimal urban disturbance. The collection took place on July 6, 2022. A total of three plants were found with morphological characteristics associated with wild genotypes and bearing fruits (**Figure 3.2 A-B**). On average, the collected plants were 1.85 meters tall, with an average of 14.3 leaves at different stages of physiological maturity. A total of 23 fruits were collected from these plants, averaging 7.66 fruits per plant. However, one plant (plant 3) produced five fruits, of which only one contained seeds. The average botanical characteristics of the fruits collected per plant are summarized in **Table 3.1**.

Characteristic	Plant 1	Plant 2	Plant 3
Polar diameter (cm)	4.999	4.443	4.893
Equatorial diameter(cm)	4.278	4.086	4.016
Weight (g)	48.428	37.328	36.20
Pulp thickness (mm)	6.710	4.598	4.990
Pulp weight (g)	19.290	8.138	7.191
Average number of seeds	125.280	165.714	138
Average seed weight (g)	0.013	0.011	0.0108
Total seed weight (g)	1.280	1.816	1.237
Brix degrees	3.042	3.871	3.60

Table 3.1. Characteristics of fruits obtained from wild *C. papaya* plants.

CAPÍTULO III

The color of all the collected fruits was a light green, characteristic of immature fruits, while the petioles varied from dark red, purple, to green with yellowish hues. During fruit ripening, they changed color, shifting to yellow and orange tones, and the firmness of the pericarp also changed (**Figure 3.2 C-E**). It was then that they were dissected to obtain the seeds (**Figure 3.2 F**).



Figure 3.2 Wild papaya plants and fruits. A-B) Plants found in areas with minimal disturbance and native vegetation, exhibiting characteristics of wild genotypes, especially the fruits (A) and the plant stem (B). C-D) Fruits harvested from the three collected plants. F) Seed extraction from mature fruits.

The seeds obtained from these wild fruits were germinated to generate the plants that were later used in the flooding experiments.

3.3.2 Effects of waterlogging on plant morphology

Maradol and wild control plants showed no morphological changes during the 72 h of the experimental period and during the subsequent 72 h. On the contrary, Maradol waterlogged plants showed an increased internal angle of the petiole with the main stem, within the first 24 h after waterlogging. Moreover, after 72 h of waterlogging, foliar damage was severe in commercial (Maradol), showing collapsed and dehydrated leaves and extended wilting, while wild papaya plants still showed turgid leaves at that stage (**Figure 3.3**).

CAPÍTULO III



Figure 3.3 Appearance of papaya plants of wild and Maradol genotypes, before they were waterlogged (control plants) and when exposed to waterlogging treatment (for 0, 24, 48 and 72 h) and during the recovery process (for 24, 48 and 72 h).

3.3.3 Physiological response to waterlogging

3.3.3.1 Dissolved oxygen

Dissolved oxygen (DO) measurements showed no changes in control pots containing purified water without plants; maintaining DO values around 5.5 mg L⁻¹ during the whole experimental period. On the contrary, when plants were exposed to waterlogging, DO values decreased in both genotypes during the initial 24 h to values around 3 mg L⁻¹. However, at 48 and 72 h of being exposed to waterlogging, commercial (Maradol) plants showed DO values as low as 1 mg L⁻¹, while the wild genotype showed DO values around 2 mg L⁻¹ (**Figure 3.4**).



Figure 3.4. Dissolved Oxygen (DO) concentrations in the water of control pots, and in the water of the pots used to impose the waterlogging treatments to plants from wild and Maradol genotypes (measured at 0, 24, 48 and 72 h). The bars in each point are mean \pm SD. Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

3.3.4 Leaf fluorescence parameters

Fv/Fm ratio in control plants of both genotypes remained close to 0.8 during the whole experimental period. Waterlogged plants on the other hand, showed decreased Fv/Fm values. After 48 h of being waterlogged, plants from the wild genotype showed values ranging between 0.7 and 0.6 and remained at those values towards the end of waterlogging and recovery periods. On the contrary, Maradol plants, although they showed similar values than the wild genotype during the first 24 h of the waterlogging period; their Fv/Fm values decreased significantly at 48 and 72 h of recovery, to values as low as 0.23 and 0.10, respectively (**Figure 3.5a**). Therefore, the main difference between both genotypes in Fv/Fm ratio was observed during the recovery period. For the variable Plabs, control plants showed values around 5 and 6 during most of the experimental period, although towards the end of the experiment they showed values close to 7. On the contrary, waterlogged plants showed a sustained decline in Plabs during the first 24 h of

waterlogging, and remained low even during the recovery period, reaching values near 1, without statistical difference between genotypes (**Figure 3.5b**).



Figure 3.5 Fluorescence parameters: a) maximum yield of PSII (Fv/Fm) and b) Photosynthetic potential index (Plabs) in both wild and Maradol papaya genotypes in control plants, and during waterlogging (for 0, 24, 48 and 72 h) and during the recovery stage (for 0, 24, 48 and 72 h). The bars in each point are mean \pm SD. Different letters indicate significant differences at (p < 0.05).

In terms of OJIP analysis (Chlorophyll a fluorescence induction kinetics), control plants of both genotypes exhibited typical OJIP curves, where fluorescence inflections occurred in each respective phase (O, J, I, P), reaching maximal fluorescence values around 30,000, indicating the absence of any interruption in the electron transport chain (**Figure 3.6a**). On the contrary, in Maradol waterlogged plants the OJIP curves were completely flattened after the initial phase (O) even after 72 h of the recovery period, failing to show the expected increase in fluorescence (with maximal fluorescence values as low as 6000), suggesting a possible disruption in the electron transport chain from quinone A (QA) oxidation (**Figure 3.6b**). Moreover, in Maradol the fluorescence intensity from O to P point did not change and remained significantly lower than that shown by the wild genotype. In contrast, the OJIP curves from waterlogged wild plants showed increased fluorescence in the O and J phases, like those of control plants, the subsequent I and P phases also exhibited a considerable increase reaching maximal fluorescence values of around 18,000. Therefore, in terms of OJIP test, wild papaya plants showed less severe affectation to waterlogging than the commercial (Maradol) genotype.



Figure 3.6 OJIP curves (fluorescence vs time, ms) of both Maradol and wild papaya genotypes. a) Before plants were waterlogged, b) control and waterlogged plants from both genotypes after 72 h recovery. O, J, I, P inflection points are indicated.

3.3.5 Gas exchange parameters

In control plants of both genotypes, net Photosynthetic rates (Pn) remained between values of 9– 11 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹ during the whole experimental period. In waterlogged plants however, a significant decrease in Pn occurred after 24 h of waterlogging, but wild plants maintained slightly higher Pn values than Maradol plants. After 48 h of waterlogging both genotypes reached values close to 0 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹. However, at the end of the 72 h recovery period, waterlogged wild plants maintained Pn values near 0 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹, while Maradol waterlogged plants reached even lower values of around -2 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (**Figure 3.7a**).

Stomatal conductance (gs) exhibited a similar pattern to that of photosynthesis, control plants of both genotypes-maintained values around 0.6 mol H₂O m⁻² s⁻¹ during the whole experimental period. On the contrary, plants exposed to waterlogging for 24 h, showed a significant decrease in gs in both genotypes. After 72 h of waterlogging, and even after 72 h of the recovery period, plants from both genotypes reached values close to 0 mol H₂O m⁻² s⁻¹ (**Figure 3.7b**).

In terms of transpiration (E), control plants from both genotypes showed differences, with wild plants showing values close to 9 mmol $H_2O~m^{-2}~s^{-1}$, while Maradol remained at E values around 6 mmol $H_2O~m^{-2}~s^{-1}$. Under waterlogging however, transpiration decreased from 24 h after waterlogging in both Maradol and wild waterlogged plants, remaining at E values close to 0 mmol

 $H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ after 48 and 72 h under waterlogging and even after 72 h of the recovery period (**Figure 3.7c**).

Intercellular CO₂ (Ci) concentration did not show differences between genotypes at control plants, both showing values close to 350 µmol CO₂ mol⁻¹ over time. On the contrary, waterlogged Maradol plants showed a significant increase in Ci values from 48 h of waterlogging, reaching values of 450 µmol CO₂ mol⁻¹, while in the wild genotype, Ci values remained low (around 380 µmol CO₂ mol⁻¹). In the subsequent days of being exposed to waterlogging and during the recovery period, waterlogged Maradol plants increased Ci even further to 600 µmol CO₂ mol⁻¹, while waterlogged wild plants remained at 450 µmol CO₂ mol⁻¹ (**Figure 3.7d**). This suggests that when waterlogged, leaves of Maradol plants showed not only lower photosynthesis, but they can even experience higher respiration rates than wild plants.



Figure 3.7. Gas exchange parameters: a) photosynthesis (Pn), b) Stomatal Conductance (gs), c) Transpiration (E), and d) Intercellular CO₂ (Ci) in both wild and Maradol papaya genotypes in control and waterlogged plants (for 0, 24, 48 and 72 h) and during the recovery period (at 0, 24, 48 and 72 h). The bars in each point are mean \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences at (p < 0.05).

3.3.6 Electrolyte leakage (membrane integrity)

Control plants of both genotypes exhibited basal electrolyte leakage (EL) values from 10 to 15% during the whole experimental period. Waterlogged plants on the other hand, showed increased EL percentage. In the case of wild waterlogged plants, EL values increased to 20% at 24 h after waterlogging, indicating some degree of cell membrane damage, but remained at those values at the end of the waterlogging treatment (72 h). On the contrary, in Maradol plants, the increase in EL percentage went from around 10% at 0 h to 14% at 24 h, 20% at 48 h, and up to 30% after 72 h of waterlogging (**Figure 3.8**). This is evidence of progressive and severe damage to the cell membrane of Maradol waterlogged plants. Therefore, during waterlogging, Maradol plants experienced higher degree of damage to cell membranes than did wild papaya plants.



Figure 3.8 Electrolyte leakage (EL) in both wild and Maradol papaya genotypes in control and waterlogged plants (at 0, 24, 48, and 72 h). The bars in each point are means \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences at (p < 0.05).

3.3.7 Leaf water relations

In control plants of both genotypes, water potential (Ψ_w) (-0.5 MPa), osmotic potential (Ψ_s) (-1.5 MPa), and hydrostatic pressure (Ψ_p) (1 MPa) potential, remained constant throughout the entire experiment (**Figure 3.9**). On the contrary, in waterlogged Maradol plants, potentials decreased during the first 24 h of waterlogging, to values around -0.74 MPa for Ψ_w , -1.34 MPa for Ψ_s and 0.63 MPa Ψ_p . (**Figure 3.9a**). However, in the wild genotype leaf Ψ_w did not decrease during the first 24 h and 48 h, remaining at similar values to those of control plants (**Figure 3.9b**). In the following 48 h of waterlogging, there were no changes in water potential compared to the previous day; however, after 72 h of waterlogging, Maradol plants reached Ψ_w values of -1 MPa, Ψ_s values of -1.28 MPa and Ψ_p (0.28 MPa) (**Figure 3.9a**) that were much lower than those of the wild genotype Ψ_p of 0.51 MPa (**Figure 3.9b**), consistent with observations at the end of the waterlogging period where the leaves from the wild genotype appeared more turgid than those of Maradol (**Figure 3.3**).



Figure 3.9 Osmotic (Ψ_s), Water (Ψ_w), and hydrostatic pressure potential (Ψ_p) potentials in a) Maradol and b) wild papaya genotypes measured at 0, 24, 48 and 72 h. Control (non-waterlogged) papaya plants for both genotypes (empty symbols). Waterlogged papaya plants for both genotypes (Black symbols). The bars in each point mean ± SD. Different letters indicate statistically significant differences at (p < 0.05).

3.3.8 Correlations between physiological parameters with Ψ_w and with DO under waterlogging treatments

Both dissolved oxygen concentration (DO; **Figure 3.4**) and leaf water potential (Ψ_w ; **Figure 3.9**) decreased (became more negative), as the waterlogging exposure progressed. To define which of these parameters had more effect on plant physiological performance, each physiological parameter measured during the waterlogging experiment was correlated with either its water potential (Ψ_w) (**Figure 3.10**) or with the corresponding dissolved oxygen (DO) values (**Figure 3.11**), through best-fit regressions.

Relatively low correlations (R²< 0.5) were observed among all physiological parameters with Ψ_w (Figure 3.10). A positive correlation was found between fluorescence parameters and Ψ_w , indicating that as Ψ_w values became more negative, the Fv/Fm (Figure 3.10a) and Plabs (Figure 3.10b) parameters also decreased. In contrast, for the EL parameter (Figure 3.10c), a negative correlation was observed, indicating that the more negative the Ψ_w values, the higher the EL percentage (increased membrane damage). Likewise, gas exchange parameters showed low positive correlations with Ψ_w (R²< 0.5), R² = 0.40 for Pn (Figure 3.10d), 0.48 for gs (Figure 3.10e), and 0.42 for E (Figure 3.10f).

CAPÍTULO III

On the contrary, high correlations ($R^2 > 0.5$) were observed among most physiological parameters with DO (**Figure 3.11**). Fluorescence parameters showed positive correlations with DO $R^2 = 0.46$ for Fv/Fm (**Figure 3.11a**) and $R^2 = 0.63$ for Plabs (**Figure 3.11b**). The correlation between EL and DO was negative ($R^2 = 0.46$), meaning that the lower the DO concentration, the higher the EL percentage (higher membrane damage) (**Figure 3.11c**). In terms of gas exchange parameters, very high positive correlations were found with DO ($R^2 > 0.9$); $R^2 = 0.92$ for Pn (**Figure 3.11d**), $R^2 = 0.97$ for gs (**Figure 3.11e**), and $R^2 = 0.9$ for E (**Figure 3.11f**). Therefore, changes in physiological performance in papaya plants exposed to waterlogging, showed stronger correlations with the decreased concentration of DO than with the decreased (more negative) leaf water potential (Ψ_w) of waterlogged papaya plants. Thus, the negative effects of waterlogging on plant performance occurred more as a result of hypoxia than as a result of changes in internal water status.

Different correlations were also found between genotypes in terms of DO and Ψ_w with the corresponding physiological parameters. For instance, the wild genotype showed higher correlations between DO vs electrolyte leakage (EL; R²=0.94) than Maradol (R²=0.77). Similarly, the wild genotype also showed higher correlations between Ψ_w vs EL (R²=0.50 than Maradol, R²=0.45), supporting that the wild genotype was able to maintain higher membrane integrity under waterlogging while maintaining higher DO than the commercial counterpart.

On the contrary, Maradol had higher correlations between Ψ_w with most of the physiological parameters measured than the wild genotype (R²=0.58 vs 0.53 for Pn; R²=0.65 vs 0.49 for gs; R²=0.66 vs 0.53 for E; R²=0.71 vs 0.31 for Fv/Fm; and R²=0.63 vs 0.52 for Piabs). Indicating that in Maradol, gas exchange parameters decreased as leaf water potential decreased as a result of waterlogging, while in the wild genotype, the decrease in gas exchange parameters was less associated with the decrease in leaf water potential induced by waterlogging.



Figure 3.10 Correlations between leaf water potential (Ψ_w) and various physiological parameters: a) Fv/Fm, b) Plabs, c) Electrolyte Leakage (EL), d) Photosynthesis (Pn), e) Stomatal Conductance (gs), and f) Transpiration (E) measured during the waterlogging treatment. R² values are shown in each case, black circles correspond to the wild genotype, and white circles correspond to the Maradol genotype.



Figure 3.11. Correlations between Dissolved Oxygen (DO) concentration and various physiological parameters: a) Fv/Fm, b) Plabs, c) Electrolyte Leakage (EL), d) Photosynthesis (Pn), e) Stomatal Conductance (gs), and f) Transpiration (E) measured during the waterlogging exposure. R² values are shown in each case, black circles correspond to the wild genotype, white circles correspond to the Maradol genotype.

3.4 DISCUSSION

The aim of the present study was to characterize and compare the physiological response of two papaya genotypes (wild and commercial) to waterlogging, to evaluate if the wild genotype might be more resilient than its commercial counterpart. Our results indicate that the wild papaya genotype was effectively more resilient to waterlogging than the commercial genotype (Maradol). Maradol plants was less turgid after 72 h of waterlogging conditions, and they never recovered when the disturbance was removed (during the recovery period). This is consistent with previous studies (Rodríguez et al. 2014; Thani et al. 2016), where Red Lady commercial papaya cultivar was observed to be highly susceptible to waterlogging.

On the contrary, wild waterlogged plants showed less leaf damage (more turgid) than the commercial genotype after 72 h of waterlogging. In fact, once the disturbance was removed (during the recovery period) wild plants were able to regain turgor while those from the commercial genotype remained damaged.

This was in line with our water relations results, where waterlogging resulted in a waterlogging induced water deficit condition and rapidly (during the first 24 and 48 h) decreased water potentials, osmotic potentials and turgor potentials decreased in Maradol. On the contrary, water potential of the wild genotype remained unchanged during the first 24 and 48 h of waterlogging and the decrease in water potential occurred later when compared to Maradol. As a result, wild plants showed slightly higher leaf turgor than Maradol after 72 h of waterlogging. In *Coffea arabica* L., waterlogging also resulted in a decrease in Ψ_w to values of -2 MPa after 4 days of waterlogging and as low as – 3.5 MPa after 8 days of waterlogging, while control plants remained at Ψ_w values around – 1 MPa, during the whole experimental period (León-Burgos et al. 2022).

Plants from the Wild genotype exhibited also slower oxygen absorption from water than the commercial one. In other species, the rapid intake of dissolved oxygen in water, in a waterlogged system, is a primary response to this disturbance (Lin et al. 2021).

Plants indirectly sense the lack of oxygen when they perceive changes in carbohydrate production, reactive oxygen species (ROS), ethylene, and nitric oxide (NO) (Bailey-Serres et al. 2012; Sasidharan et al. suggest that the wild papaya genotype somehow perceives oxygen deficiency faster and reduces its intake to sustain its metabolism for longer periods. It is possible that the lower oxygen deprivation in the roots of the wild genotype might allow them to remain functional for longer periods and thus they may be more capable to maintain water uptake and

CAPÍTULO III

water transport to shoots, allowing leaves to maintain turgor. Wild papaya plants exposed to waterlogging also had higher Fv/Fm values than Maradol. While both genotypes showed significantly lower Fv/Fm values than their respective controls during the waterlogging period, during the recovery period, Maradol collapsed reaching very low Fv/Fm values, whereas the wild genotype was able to increase Fv/Fm values, indicating that the photosystems in the wild genotype were less affected by waterlogging than in Maradol. Photochemical processes (measured as Fv/Fm and OJIP curves) are fundamental for photosynthesis, and Fv/Fm (maximum efficiency of photosystem II; PSII) has been used as an indicator of stress in plants due to its high sensitivity (Banks 2018; Guo et al. 2022). The re-oxygenation following waterlogging has proved to be a disturbance almost as severe as waterlogging itself (Toral-Juarez et al. 2021). During the recovery period, damage to photosynthetic apparatus and cellular membranes can occur. Therefore, our data suggest that the wild genotype possesses a more efficient mechanism to cope with post-waterlogging oxidative stress than Maradol. Fv/Fm values measured during waterlogging recovery might be useful as a non-destructive marker of waterlogging tolerance in papaya, as reported for cucurbit species (Lin et al. 2020) and avocado (Lin et al. 2022a). Waterlogged wild plants also showed better chlorophyll fluorescence kinetics (OJIP curves) performance than Maradol, indicating that in waterlogged Maradol plants, the capacity to capture photons by PSII was completely impaired, thus failing to achieve plastoquinone A (QA) reduction (Kupper et al. 2019). Waterlogged wild plants showed higher capacity to capture photons and to maintain electron transport when compared to Maradol. Direct impact of waterlogging stress on QA has been previously reported (Olorunwa et al. 2022). It has been suggested that inducing improvements in the electron chain could be an approach for genetic enhancement of papaya against waterlogging (Gu 2023).

Our results suggest that waterlogging caused more cell membrane damage (increased EL) in Maradol than in the wild genotype. Increased EL is caused by an uncontrolled flow of K+ in cells, leading to the collapse of various ion channels in the membrane (Demidchik et al. 2014). Similarly, elevated EL has been associated with the accumulation of ROS and lipid peroxidation in the membrane (Lin et al. 2022b). Studies in other species such as kiwi (Huo et al. 2022), soybean (Sathi et al. 2022), and alfalfa (Zhang et al. 2019) have reported increased EL in response to waterlogging, while a lower percentage of EL is associated with greater tolerance to this disturbance. Maintenance of cell membrane stability could be associated with increased antioxidant activity that detoxifies ROS released by the abnormal hypoxia condition caused by waterlogging (Bhusal et al. 2022). The release of ROS has a paradoxical role in the tolerance against waterlogging, as the accumulation of ROS is associated with the degradation of cell

CAPÍTULO III

membranes, but it is also associated with improvement of gas exchange and formation of aerenchyma in the roots (Pucciariello and Perata 2021). In the present study, EL increased significantly at the end of waterlogging exposure in Maradol, while in the wild genotype EL values did remain low during the waterlogging period, demonstrating greater stability of the cell membrane in the wild papaya genotype plants Therefore, membrane integrity (measured as EL) may be a trait of tolerance to waterlogging in papaya. The lower membrane damage and a better chlorophyll fluorescence kinetics suggest that the wild genotype was somehow more capable of protecting the damage caused by waterlogging to the photosynthetic apparatus, in particular avoiding damage to photosystem II. In the present study, waterlogging attenuated photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration of papaya plants in both genotypes. However, it is noteworthy that the intercellular CO₂ (Ci) remained lower in the wild genotype than in Maradol, during the waterlogging and recovery periods. Due to the physiological parallelism for both drought and waterlogging, some authors even consider them as a gradient in the soil moisture spectrum (Chen et al. 2023), a high relationship between the response of physiological parameters to waterlogging and leaf water potential could be expected. However, our results show that in waterlogged plants, gas exchange parameters positively correlated with the concentration of dissolved oxygen (DO) than with leaf water potential. High correlations between DO and gas exchange parameters have been also observed in crops cultivated in hydroponic systems, such as lettuce (Ouyang et al. 2020). Additionally, Thani et al. (2016) previously observed that the application of CaO₂ in waterlogged commercial papaya genotypes allows the recovery of gas exchange parameters to values similar to those of control plants, supporting our results. Understanding the molecular and physiological mechanisms of the differential uptake of DO between wild and commercial genotypes might be crucial for developing genetic improvements to look for papaya cultivars that could be (more) resistant to waterlogging conditions. The higher correlations found in wild plants between DO and membrane stability (EL) and between leaf water potential and EL, than in commercial ones, may suggest that the wild genotype is able to maintain oxygen availability for longer periods and it may avoid waterlogginginduced membrane damage. On the contrary, the higher correlations found in waterlogged Maradol plants between leaf water potential and physiological parameters than in waterlogged wild ones, may suggest that in Maradol, gas exchange parameters decrease as leaf water potential declines as a result of waterlogging condition, while in the wild genotype, the decrease in gas exchange parameters was less associated with the low leaf water potential resulted from waterlogging. Therefore, this indicates an increased capacity of wild plants to regulate their water relations.

Taken together, our results showed that the wild genotype was more resilient to waterlogging than its commercial counterpart Maradol, and this higher resilience is apparently associated with a better physiological performance, mainly during the recovery period.

3.5 CONCLUSIONS

The wild papaya genotype was more resilient to waterlogging than its commercial counterpart, as the wild genotype showed better physiological performance and it was able to recover when waterlogging was removed. Results from the present study, might be valuable in breeding programs aiming to generate new waterlogging-resilient papaya cultivars, and perhaps from other important tropical fruits.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TIPO ERF-VII EN *C. papaya* BAJO ESTRÉS POR ANEGAMIENTO

4.1 INTRODUCCIÓN

Las exportaciones del cultivo de papaya en México representan una entrada importante para la actividad económica del país (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2017). Sin embargo, las condiciones ambientales adversas son de las principales amenazas de la producción de este cultivo (Granados-Ramírez et al., 2015). A pesar de que, generalmente, a la papaya se le asocia el estrés abiótico con altas temperaturas y déficit hídrico (Bautista-Bautista, 2020), el estrés por anegamiento o por inundaciones puede provocar la muerte de plantas de papaya en tan solo 48 horas, ocasionado por la privación del oxígeno (Rodríguez et al., 2014). Tomando en cuenta que, las inundaciones son una de las principales consecuencias del cambio climático, es de suma importancia prestar atención al efecto que esta pueda tener en la producción de papaya.

Durante el estrés por falta de oxígeno, las plantas generan una acumulación pasiva de etileno, la cual activa los ERF (Hartman et al., 2019). La familia de FT, APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) es una superfamilia de proteínas específicas de plantas que se caracterizan por un dominio de unión al ADN por elementos APETALA2 (AP2) (Gibbs et al., 2015). Se ha identificado que, estos FT participan en procesos de desarrollo, crecimiento, estrés por patógenos y estrés abiótico (Giuntolini y Peralta, 2018). Estos AP2/ERF se subdividen en las familias: APETALA2 (AP2), RELATED TO ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3/VIVIPAROUS 1 (RAV), DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING proteins (DREBs) y ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS (ERFs) (subgrupos del V-X) (Xie et al., 2019). Esta última subfamilia, los ERFs, están directamente involucrados a diferentes tipos de estrés abiótico (**Figura 4.1**), especialmente los que corresponden a la subfamilia ERF-VII, pues se encargan de los mecanismos de tolerancia a la falta de oxígeno e inundación (Yin et al., 2019).



Figura 4.1 Tipos de estrés en los que se involucran los ERF-VII. Tomado de Xie et al. 2019.

Por su parte, la subfamilia ERF-VII se constituye de cinco miembros diferentes que comparten un dominio AP2 y uno N-terminal. Los miembros son: HYPOXIA RESPONSIVE 1 (HRE1), RELATED TO APETALA 2.2 (RAP2.2), RELATED TO APETALA 2.12 (RAP2.12); con un mismo origen sinténico, HYPOXIA RESPONSIVE 2 (HRE2) y RELATED TO APETALA 2.3 (RAP2.3) que comparten el origen con otra proteína ancestral (**Figura 4.2**) (Gibbs et al., 2015). Se ha reportado que la sobreexpresión, de todos estos genes, forma parte de los mecanismos de respuesta ante estrés por inundación, activando genes tempranos encargados de estimular el metabolismo anaeróbico, fermentación ante hipoxia prolongada y otros, en *A. thaliana* (Kim et al., 2018). Sin embargo, a la fecha no se conoce qué genes de la subfamilia ERF-VII se encuentran presentes en el genoma de *C. papaya*, lo cual resulta de gran interés debido a los daños causados por inundación en dicho cultivo. Por tanto, el objetivo del presente capítulo fue determinar la presencia de genes homólogos a la familia ERF-VII de *A. thaliana* en el genoma de *C. papaya* var. Maradol y diseñar iniciadores para el análisis de su expresión mediante RT-qPCR.



Figura. 4.2. Filogenia de los miembros de la familia ERF-VII. Tomado de Gibbs et al., 2015.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Identificación y análisis filogenético de ERF-VII en el genoma de C. papaya

La búsqueda de las secuencias de las proteínas de la subfamilia ERF-VII se realizó mediante el criterio de Cadenas Ocultas de Markov mediante HMMER. Para lo anterior se obtuvo el perfil HMM del dominio AP2 (PF00847) base de datos InterPro de la (https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF00847/logo/). La búsqueda se realizó contra el genoma de C. papaya cv. SunUp (Yue et al., 2022), el cual se obtuvo de la base de datos Genome Waren House (GWH, https://ngdc.cncb.ac.cn/gwh/) con número de acceso GWHBFSC00000000. Una vez obtenidas las secuencias que portaran el dominio AP2, se determinó la presencia de los genes HRE1, HRE2, RAP2.12, RAP2.2, RAP2.3 de A. thaliana Arabidopsis utilizando las bases de datos The Information Resource (TAIR) (https://www.arabidopsis.org/). El conjunto de las secuencias con el dominio AP2 y las secuencias de A. thaliana fueron alineadas y se realizó un análisis filogenético mediante el criterio de Unión de Vecinos Cercanos (NJ), con 1000 réplicas mediante Bootstrap, el alineamiento y la filogenia se realizaron en el Software MEGA-X (Kumar et al., 2018).

4.2.2 Análisis de Identidad y Distancia genética

Las secuencias de papaya que se encontraron en el mismo clado que las de *A. thaliana* en el árbol filogenético, y que mostraron tener las 4 estructuras características esperadas, fueron seleccionadas para hacer análisis de distancia genética e identidad. Para esto, se utilizó el
software MEGA-X, con la herramienta "Distance" utilizando un modelo de estimación de varianza tipo Bootstrap, con 999 repeticiones y con un modelo de sustitución de distancia–p. El análisis del dendrograma y los porcentajes de identidad se utilizaron para determinar con qué miembro de los ERF-VII compartían homología cada una de las secuencias.

4.2.3 Diseño 3D de las proteínas HRE y RAP

Con los resultados de la filogenia, se seleccionaron aquellas secuencias que se encontraran dentro del mismo clado que las de *A. thaliana.* Se realizó un realineamiento, en BioEdit, con las secuencias seleccionadas, las de *A. thaliana* y el dominio AP2. Además, se identificaron los dominios conservados de todas las secuencias, utilizando la herramienta en línea MEME versión 5.5.7 (https://meme-suite.org/meme/tools/meme). Posteriormente, se utilizó el software en línea AlphaFold3 (https://alphafoldserver.com/), con el que se generaron archivos tipo CIF, empleados para generar las estructuras 3D en el software Chimera X. Dentro del mismo programa, se identificó el dominio AP2, sus características (tres beta-plegadas y una alfa-hélice) y el dominio N-terminal, en cada una de las secuencias. El dominio AP2 y sus características se obtuvieron de las bases de datos Pfam (http://pfam.xfam.org/) y UniProt (https://www.uniprot.org/). Estas mismas características también se pudieron identificar en el alineamiento de BioEdit.

4.2.4 Diseño de iniciadores para los genes HRE y RAP

Se generaron los iniciadores para PCR cuantitativa (RT-qPCR) utilizando los softwares Unipro UGENE y Primer PREMIERE. Se seleccionaron los siguientes parámetros para su diseño: tamaño del iniciador de 18-25 pb, temperatura de anillamiento mínima de 60-56°C y máxima de 62°C, contenido de G-C mínimo de 40-30% y máximo 60-70%. Con los iniciadores obtenidos se hicieron análisis de PCR *in silico* con la herramienta BLAST, esto para determinar si los iniciadores correspondían a las secuencias esperadas y que tuvieran el tamaño de amplicón mayor a 100 bp. Las parejas de iniciadores seleccionadas se mandaron a sintetizar a la empresa Sigma-Aldrich (https://www.sigmaaldrich.com).

4.2.5 Ensayo de expresión de genes ERF-VII en *C. papaya* en respuesta al anegamiento

Se utilizó tejido de hojas y raíces provenientes de plantas *C. papaya* sometidas a estrés por anegamiento del experimento descrito en el Cap. III. El experimento consistió en someter a anegamiento durante 72 h dos genotipos de papaya (silvestre y Maradol), así como sus

respectivos controles. La toma del tejido foliar y radicular se llevó a cabo cada 24 h teniendo finalmente muestras a las 0, 24, 48 y 72 h en anegamiento de ambos genotipos.

4.2.5.1 Extracción de ARN total

Utilizando las muestras foliares y de raíces del experimento, se obtuvo ARN para evaluar la expresión de los genes ERF-VII. Para la extracción se utilizó un protocolo basado en lisis por CTAB. El tejido colectado fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y posteriormente macerado en nitrógeno líquido, se utilizaron 100 mg de hoja y 300 mg de raíz. Posteriormente, se añadieron 800 µl de buffer CTAB (CTAB 2%, Tris-HCl 0.95 M pH 8.0, EDTA 250 mM pH 8.0, NaCl 3M, PVP 2%, β-mercaptoetanol 2.5%) precalentado a 60 °C, la mezcla se llevó al vortex por 30s, tras lo cual los tubos fueron enfriados inmediatamente en hielo para ser incubados seguidamente durante 15 min a 60 °C, agitando cada 2 min. Posterior a la incubación, se añadieron al tubo 650 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se incubó a -20 °C durante 15 min. A continuación, se centrifugó a 15 000 g durante 15 min a 4 °C, tras lo cual se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 400 µl de LiCl (7.5 M), se agitó gentilmente y se incubó a -80 °C durante toda la noche. Para continuar, se realizó una centrifugación a 15 000 g durante 40 min y se desechó el sobrenadante mediante decantación. Se disolvió la pastilla formada en 80 µL agua ultra pura y se añadieron 25 µL de etanol al 70% y 10 µL de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) frío, tras lo cual se dio un pulso de centrifuga y se incubó a -80 °C durante 1h. Se centrifugó, nuevamente, a 15 000 g a 4 °C por 40 min y se agregaron 200 µL de etanol al 75% enfriado a -20 °C. Por último, se centrifugó a 15 000 g a 4 °C por 15 min, se decantó el sobrenadante y se permitió que la pastilla se secara al aire para, finalmente, disolver la pastilla en 30 µL de agua ultra pura y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se determinó la integridad del RNA en gel de agarosa (1%, 90 V, 40 min) y su calidad mediante espectrofotometría en Nanodrop.

4.2.5.2 Tratamiento con DNAsa y Retrotranscriptasa

El ARN obtenido se sometió a una limpieza de ADN con la enzima Turbo DNA-free® (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. A partir de 500 ng de ARN se llevó a cabo el proceso de síntesis de cDNA utilizando la Transcriptasa Inversa SuperScript ® IV (Invitrogen) e iniciadores aleatorios a 3 μ g μ l⁻¹ (Invitrogen).

4.2.5.3 Amplificación de genes ERF-VII por PCR punto final

Utilizando los primers diseñados en este capítulo, se llevó a cabo la amplificación de los ERF-VII identificados previamente. Las condiciones de reacción utilizadas fueron: Buffer para PCR 10x, 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP Mix, 10 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 500 ng de cDNA a un volumen final de 25 µL. El programa térmico consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 30 s a 95°C, anillamiento durante 30 s a 62°C y 1 min a 72°C de extensión, de 72°C por 5 min y se corrió en un termociclador marca Applied Biosystems Veriti® (EEUU) El producto de PCR se analizó en gel de agarosa al 1.5%, teñido con SybrSafe® (Invitrogen), visualizado bajo luz ultravioleta.

4.2.5.4 Validación de iniciadores para amplificación en RT-qPCR

Para determinar la viabilidad de los iniciadores diseñados para ensayos de expresión RT-qPCR se realizó una curva estándar para cada gen de interés. Para esto se realizaron tres diluciones seriadas 1:10 (300, 30, 3 ng μ l⁻¹) de cDNA con una buena banda de amplificación observada en el ensayo de PCR en punto final. Las condiciones de reacción fueron: Sybr Green Master Mix 2x (Applied Biosystems), 5 μ M de cada iniciador, a un volumen final de 10 μ L. El programa térmico consistió en: desnaturalización inicial a 50°C por 2 min, seguido de 2 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 3 s y anillamiento a 62° por 30 s, siendo en este último punto donde se cuantificó la fluorescencia. Posterior al programa de ciclado se realizó una curva Melt de 60°C a 95°C.

4.2.5.5 Ensayo de expresión de ERF-VII

Se realizó la cuantificación de la expresión relativa en tiempo real de los genes ERF-VII para lo cual se utilizó las condiciones de reacción previamente descritas utilizando una concentración de 300 ng de cada muestra, con tres réplicas biológicas por cada tratamiento (anegamiento y control) de cada genotipo (silvestre y Maradol) por cada tiempo (24, 48 y 72 h en anegamiento). Se utilizó como gen normalizador de expresión endógena el gen EF1 α (Estrella-Maldonado et al., 2016). El nivel de expresión relativa (REL) se determinó mediante el método 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} y se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía, en el software R v.4.3.2.

4.2.5.6 Análisis estadístico

Para analizar las diferencias estadísticas entre los tratamientos y genotipos en este estudio, se aplicaron diversos métodos estadísticos. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de determinar la existencia de diferencias significativas en las variables evaluadas entre los distintos tratamientos y genotipos.

El ANOVA permitió identificar las principales fuentes de variación y estimar la influencia relativa de los tratamientos y genotipos sobre la variabilidad observada en las variables de interés. Se estableció un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 0.05$) para determinar si las diferencias detectadas eran estadísticamente significativas. Adicionalmente, se utilizó una prueba t de dos colas para realizar comparaciones específicas entre grupos. Esta prueba permitió evaluar diferencias entre pares de tratamientos y genotipos, identificando aquellos que presentaban diferencias significativas. Al igual que en el ANOVA, se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

Previo a la aplicación de estos análisis, se verificó el supuesto de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, con un nivel de significancia de 0.05, para comprobar si los datos seguían una distribución normal. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R versión 4.1.3 (2022-03-10).

Asimismo, se llevaron a cabo análisis de correlación entre las variables fisiológicas estudiadas y los valores REL de cada gen. Para ello, se empleó el software Past 3.24, obteniendo los coeficientes de determinación (R²), valores de p y gráficos correspondientes.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificación de las secuencias ERF-VII en el genoma de C. papaya

A partir del perfil HMM del dominio AP2 (PF00847) se realizó la búsqueda de todas las secuencias que contuvieran dicho dominio en el proteoma de *C. papaya* var. SunUp (GCA_022788785.1) mediante el software HMMER. La búsqueda identificó 130 proteínas que contienen al menos un dominio AP2, completa o parcialmente. En la **Tabla 4.1** se muestra el identificador de cada secuencia proteica encontrada, el E-value asociado, así como el *locus* y el cromosoma en que se encontró.

Tabla 4.1. Resultados del BLAST de las secuencias de *A. thaliana* de todos los ERF en el genoma *C. papaya* recuperados mediante HMMER.

Secuencia proteína	E-value	Locus	Cromosoma
GWHPBFSC019619	1.10E-23	GWHGBFSC017780	Chr7
GWHPBFSC009133	4.50E-21	GWHGBFSC008246	Chr4
GWHPBFSC020081	7.10E-21	GWHGBFSC018209	Chr8
GWHPBFSC021418	1.30E-20	GWHGBFSC019407	Chr8
GWHPBFSC020337	2.00E-20	GWHGBFSC018436	Chr8
GWHPBFSC005789	4.50E-20	GWHGBFSC005236	Chr2
GWHPBFSC009239	6.20E-19	GWHGBFSC008346	Chr4
GWHPBFSC019425	1.40E-18	GWHGBFSC017604	Chr7
GWHPBFSC010906	2.60E-18	GWHGBFSC009866	Chr4
GWHPBFSC002984	1.20E-17	GWHGBFSC002697	Chr1
GWHPBFSC009331	2.30E-17	GWHGBFSC008432	Chr4

-				
	GWHPBFSC006849	6.30E-17	GWHGBFSC006179	Chr3
	GWHPBFSC017982	8.50E-17	GWHGBFSC016278	Chr7
	GWHPBFSC001010	1.50E-16	GWHGBFSC000922	Chr1
	GWHPBFSC008732	2.00E-16	GWHGBFSC007883	Chr3
	GWHPBFSC010081	2.20E-16	GWHGBFSC009116	Chr4
	GWHPBFSC006848	3.20E-16	GWHGBFSC006178	Chr3
	GWHPBFSC009094	4.40E-16	GWHGBFSC008210	Chr4
	GWHPBFSC016418	6.50E-16	GWHGBFSC014878	Chr6
	GWHPBFSC012734	7.10E-16	GWHGBFSC011513	Chr5
	GWHPBFSC007161	7.20E-16	GWHGBFSC006461	Chr3
	GWHPBFSC010752	8.10E-16	GWHGBFSC009736	Chr4
	GWHPBFSC001134	9.90E-16	GWHGBFSC001035	Chr1
	GWHPBFSC013399	9.90E-16	GWHGBFSC012115	Chr5
	GWHPBFSC001157	1.30E-15	GWHGBFSC001058	Chr1
	GWHPBFSC018224	1.40E-15	GWHGBFSC016494	Chr7
	GWHPBFSC004340	1.50E-15	GWHGBFSC003945	Chr2
	GWHPBFSC011812	1.50E-15	GWHGBFSC010690	Chr4
	GWHPBFSC012936	1.60E-15	GWHGBFSC011688	Chr5
	GWHPBFSC010128	1.70E-15	GWHGBFSC009160	Chr4
	GWHPBFSC000903	1.80E-15	GWHGBFSC000822	Chr1
L		•		

GWHPBFSC014787	1.80E-15	GWHGBFSC013380	Chr6
GWHPBFSC017923	1.90E-15	GWHGBFSC016226	Chr7
GWHPBFSC014041	2.50E-15	GWHGBFSC012707	Chr5
GWHPBFSC006850	2.90E-15	GWHGBFSC006180	Chr3
GWHPBFSC023122	2.90E-15	GWHGBFSC020931	Chr9
GWHPBFSC006448	3.00E-15	GWHGBFSC005818	Chr3
GWHPBFSC002482	3.30E-15	GWHGBFSC002254	Chr1
GWHPBFSC017326	4.70E-15	GWHGBFSC015701	Chr6
GWHPBFSC016975	4.80E-15	GWHGBFSC015385	Chr6
GWHPBFSC015759	5.00E-15	GWHGBFSC014265	Chr6
GWHPBFSC005265	5.20E-15	GWHGBFSC004772	Chr2
GWHPBFSC003248	5.60E-15	GWHGBFSC002939	Chr2
GWHPBFSC011368	5.60E-15	GWHGBFSC010279	Chr4
GWHPBFSC002300	5.70E-15	GWHGBFSC002090	Chr1
GWHPBFSC022017	5.80E-15	GWHGBFSC019953	Chr8
GWHPBFSC017921	6.90E-15	GWHGBFSC016224	Chr7
GWHPBFSC018837	7.60E-15	GWHGBFSC017067	Chr7
GWHPBFSC008595	7.70E-15	GWHGBFSC007761	Chr3
GWHPBFSC017034	8.00E-15	GWHGBFSC015444	Chr6
GWHPBFSC014727	8.80E-15	GWHGBFSC013326	Chr6

GWHPBFSC010082	9.10E-15	GWHGBFSC009117	Chr4
GWHPBFSC010045	1.20E-14	GWHGBFSC009085	Chr4
GWHPBFSC023042	1.20E-14	GWHGBFSC020859	Chr9
GWHPBFSC007077	1.40E-14	GWHGBFSC006382	Chr3
GWHPBFSC023124	1.80E-14	GWHGBFSC020933	Chr9
GWHPBFSC015577	1.80E-14	GWHGBFSC014090	Chr6
GWHPBFSC008734	1.90E-14	GWHGBFSC007885	Chr3
GWHPBFSC008733	2.10E-14	GWHGBFSC007884	Chr3
GWHPBFSC022339	2.10E-14	GWHGBFSC020236	Chr9
GWHPBFSC016861	2.30E-14	GWHGBFSC015282	Chr6
GWHPBFSC010360	2.70E-14	GWHGBFSC009367	Chr4
GWHPBFSC010310	2.80E-14	GWHGBFSC009321	Chr4
GWHPBFSC021624	3.30E-14	GWHGBFSC019598	Chr8
GWHPBFSC000692	3.80E-14	GWHGBFSC000628	Chr1
GWHPBFSC004311	4.80E-14	GWHGBFSC003916	Chr2
GWHPBFSC013020	5.00E-14	GWHGBFSC011763	Chr5
GWHPBFSC023121	5.10E-14	GWHGBFSC020930	Chr9
GWHPBFSC002705	5.10E-14	GWHGBFSC002452	Chr1
GWHPBFSC002704	7.20E-14	GWHGBFSC002451	Chr1
GWHPBFSC021622	8.30E-14	GWHGBFSC019596	Chr8
	•		

GWHPBFSC014337	1.00E-13	GWHGBFSC012976	Chr5
GWHPBFSC014186	1.20E-13	GWHGBFSC012840	Chr5
GWHPBFSC007397	1.90E-13	GWHGBFSC006675	Chr3
GWHPBFSC014029	2.40E-13	GWHGBFSC012696	Chr5
GWHPBFSC018494	3.30E-13	GWHGBFSC016747	Chr7
GWHPBFSC021146	6.00E-13	GWHGBFSC019173	Chr8
GWHPBFSC008506	8.10E-13	GWHGBFSC007682	Chr3
GWHPBFSC020954	1.10E-12	GWHGBFSC019001	Chr8
GWHPBFSC003949	1.10E-12	GWHGBFSC003587	Chr2
GWHPBFSC002409	1.20E-12	GWHGBFSC002188	Chr1
GWHPBFSC019193	1.20E-12	GWHGBFSC017387	Chr7
GWHPBFSC012496	1.70E-12	GWHGBFSC011298	Chr5
GWHPBFSC010985	1.80E-12	GWHGBFSC009937	Chr4
GWHPBFSC012491	2.10E-12	GWHGBFSC011294	Chr5
GWHPBFSC019267	2.20E-12	GWHGBFSC017455	Chr7
GWHPBFSC002804	2.80E-12	GWHGBFSC002537	Chr1
GWHPBFSC009136	3.40E-12	GWHGBFSC008249	Chr4
GWHPBFSC005790	3.60E-12	GWHGBFSC005236	Chr2
GWHPBFSC018420	3.80E-12	GWHGBFSC016676	Chr7
GWHPBFSC013400	4.50E-12	GWHGBFSC012115	Chr5

GWHPBFSC021461	6.70E-12	GWHGBFSC019446	Chr8
GWHPBFSC012493	9.20E-12	GWHGBFSC011296	Chr5
GWHPBFSC018087	1.30E-11	GWHGBFSC016375	Chr7
GWHPBFSC010127	5.20E-11	GWHGBFSC009159	Chr4
GWHPBFSC003851	5.40E-11	GWHGBFSC003496	Chr2
GWHPBFSC022948	6.60E-11	GWHGBFSC020773	Chr9
GWHPBFSC002697	1.80E-10	GWHGBFSC002445	Chr1
GWHPBFSC008128	6.30E-10	GWHGBFSC007332	Chr3
GWHPBFSC002894	6.50E-10	GWHGBFSC002616	Chr1
GWHPBFSC003897	1.60E-09	GWHGBFSC003538	Chr2
GWHPBFSC002895	2.80E-09	GWHGBFSC002616	Chr1
GWHPBFSC022875	6.30E-09	GWHGBFSC020706	Chr9
GWHPBFSC020953	3.70E-08	GWHGBFSC019001	Chr8
GWHPBFSC018092	2.50E-07	GWHGBFSC016377	Chr7
GWHPBFSC018091	3.20E-07	GWHGBFSC016377	Chr7
GWHPBFSC017218	1.10E-06	GWHGBFSC015611	Chr6
GWHPBFSC019708	7.40E-06	GWHGBFSC017861	Chr7
GWHPBFSC019707	7.60E-06	GWHGBFSC017861	Chr7
GWHPBFSC002745	2.80E-05	GWHGBFSC002485	Chr1
GWHPBFSC001009	0.0018	GWHGBFSC000921	Chr1

GWHPBFSC022000	0.004	GWHGBFSC019936	Chr8
GWHPBFSC021195	0.59	GWHGBFSC019216	Chr8
GWHPBFSC000346	0.64	GWHGBFSC000313	Chr1
GWHPBFSC015133	1.7	GWHGBFSC013693	Chr6
GWHPBFSC014436	2	GWHGBFSC013067	Chr5
GWHPBFSC001917	2.1	GWHGBFSC001741	Chr1
GWHPBFSC015134	2.3	GWHGBFSC013694	Chr6
GWHPBFSC015371	2.9	GWHGBFSC013905	Chr6
GWHPBFSC015372	2.9	GWHGBFSC013905	Chr6
GWHPBFSC013561	3.2	GWHGBFSC012268	Chr5
GWHPBFSC005597	3.3	GWHGBFSC005069	Chr2
GWHPBFSC024469	3.9	GWHGBFSC022172	ChrHSY
GWHPBFSC022911	4.1	GWHGBFSC020738	Chr9
GWHPBFSC008296	4.8	GWHGBFSC007488	Chr3
GWHPBFSC003341	6.4	GWHGBFSC003025	Chr2
GWHPBFSC001860	6.8	GWHGBFSC001687	Chr1
GWHPBFSC011912	7.8	GWHGBFSC010782	Chr5
GWHPBFSC009674	8.6	GWHGBFSC008744	Chr4
GWHPBFSC011876	9.9	GWHGBFSC010749	Chr4

4.3.2 Análisis filogenético de las secuencias de ERF-VII de C. papaya

Las 130 secuencias obtenidas mediante HMMER, se utilizaron para realizar el análisis filogenético, además se incluyeron las secuencias de las proteínas pertenecientes a la subfamilia ERF-VII de *A. thaliana.* La filogenia arrojó numerosos clados, sin embargo, de acuerdo con los intereses del presente trabajo, se prestó especial atención al clado en que se ubicaron las secuencias de las proteínas AtRAP2.2, AtRAP2.3, AtRAP2.12, AtHRE1 y AtHRE2. En dicho clado (**Figura 4.3**) se observó que se posicionaron cinco secuencias de proteínas de *C. papaya*: GWHPBFSC010985, GWHPBFSC012491, GWHPBFSC012493, GWHPBFSC012496 y GWHPBFSC008595.



Figura 4.3. Reconstrucción filogenética de los genes pertenecientes a la superfamilia ERF de *C. papaya*. Se señala (azul) el subclado ERF-VII, en el que se localizaron las secuencias de *A. thaliana* (circulo amarillo) y de *C. papaya*. Se utilizó un modelo de Unión de Vecinos Cercanos (NJ), con 1000 réplicas mediante Bootstrap.

Para determinar las relaciones internas de este subclado, de forma más precisa, se realizó otro análisis filogenético con estas secuencias y las de *A. thaliana*. Esta subfilogenia (**Figura 4.4**) mostró claramente que la proteína GWHPBFSC010985 de *C. papaya* muestra homología con las proteínas AtRAP2.2 y RAP2.12, mientras que la proteína GWHPBFSC008595 es homóloga

a la proteína AtRAP2.3, por otro lado, las proteínas de *C. papaya* GWHPBFSC012491, GWHPBFSC012493, GWHPBFSC012496 son homólogas a la proteína AtHRE2.



Figura 4.4. Filogenia del subclado ERF-VII de las secuencias *A. thaliana* (triángulo azul) con sus respectivas secuencias identificadas en *C. papaya* (circulo naranja). Se identificó una secuencia homóloga a las de *A. thaliana* que son AtRAP2.2 y AtRap2.12 (rectángulo azul), ninguna a AtHRE1 (rectángulo rojo), una secuencia a AtRAP2.3 (rectángulo amarillo) y tres a AtHRE2 (rectángulo verde).

4.3.3 Análisis de Distancia

El análisis de distancia mostró que, para la proteína GWHPBFSC010985 su menor distancia basada en las secuencias de aminoácidos es con la proteína AtRAP2.12, mientras que para la proteína GWHPBFSC008595 muestra una menor distancia con respecto de la proteína AtRAP2.3. Asimismo, las proteínas GWHPBFSC012491, GWHPBFSC012493 y GWHPBFSC012496 muestran una menor distancia con respecto a la proteína AtHRE2. Los resultados se resumen en la **Tabla 4.2**.

	GWHPBF SC010985	GWHPBFSC 008595	GWHPBFS C012491	GWHPBFS C012493	GWHPBFSC 012496
At_RAP2.2	0.441	0.670 0.633 0.7		0.705	0.652
At_RAP2.3	0.642	0.032	0.662	0.716	0.679
At_RAP2.12	0.027 0.038		0.030	0.029	0.030
At_HRE1	0.584 0.		0.662	0.696	0.668
At_HRE2	0.554	0.038	0.041	0.038	0.037

Tabla 4. 2. p-distancia entre las proteínas correspondientes de A. thaliana y las secuencias de C. papaya.

Por tanto, con base en estos resultados y respaldado por los resultados de la filogenia del subclado, podemos inferir que la proteína GWHPBFSC010985 es homóloga a la proteína AtRAP2.12, por lo cual se le considera como CpRAP2.12; para la proteína GWHPBFSC008595 la evidencia muestra que es homóloga a la proteína AtRAP2.3, por lo cual se le considera como CpRAP2.3. Por último, las proteínas GWHPBFSC012491, GWHPBFSC012493 y GWHPBFSC012496 parecen ser homólogas a la proteína AtHRE2, sin embargo, con base en la distancia estimada, se considera que la proteína GWHPBFSC012496 es CpHRE2, mientras que GWHPBFSC012493 se nombra como CpHRE2-like1 y a GWHPBFSC012491 se le etiqueta como CpHRE2-like2 (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3 Matriz de identidad de las secuencias tipo ERF-VII de *A. thaliana* respecto a las secuencias de

 C. papaya.

	CpRAP2.12	CpRAP2.3	CpHRE2- like1	CpHRE2- like2	CpHRE2
At_RAP2.2	55.9	33	36.7	29.5	34.8
At_RAP2.3	35.8	96.8	33.8	28.4	32.1
At_RAP2.12	.12 97.3 96.1		97	97.1	97
At_HRE1	41.6	30.3	33.8	30.4	33.2
At_HRE2	44.6	96.2	95.9	96.2	96.3

4.3.4 Alineamiento e identificación de dominios

Se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias de *A. thaliana* y las identificadas en *C. papaya*, así como del dominio AP2 y N-terminal utilizados para la clasificación dentro de la familia ERF-VII.

	N-terminal 10	20	30	40	50
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	MCGGAIISDFIPPP- MCGGAIISDFIPTA MCGGAIISDFIPTA MCGGAIISDFVPVTT MCGGAIISDFVPVTT MCGGAIIADFIPRI- MCGGAIVADFIRRI- MCGGAIVADFIRRI- MCGGAISDFIPPP- MCGGAVISDVIAPE-	- RSRRITAFUL RSRRITAEEL - RSRRITAFUL - RSRRSTAVEH - RSRRSTAVEH - RSLRVTNEFI	WPDLKKNLK WPDLNRNRA WSELDASAA WSELDASAA WSELDASAA WSELDASA WPGSTSANS WPDSTSANS WPDSTSANS WPDLKNKVK	GSKKSSKNR - SKKSS-KR DDFWGFYST - DLWGLDSM NCNDSDKKL DCNDSDKKL ASKKRSNKR SSGKSSWRS	SSEVER SSEVEN SS
	60	70	80	90	100
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	FDA - EFEADFQGFKD LDD - DFEADFQGFKD T	D - S S I D C D D F D D E S D I D V D E D L D P	- UGDVFADV DIDAVFSDI	KPFVFTSTP KPFAFSATP NOVVTSEKA GSVSSRKKR EPVS-LKRT EPVS-LKRT KPFVFTATT PFVFSSTH	KPAKS VKKUSV VKKUSV EKPVSV LPTSD LPTSD LPTSD LPTSD LPTSD KKH
	110	120	130	140	150
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	AAAEGSVFG TASALSNGSKP ATE	KKVTGLDGDA KKVTGLDGDA VKAVEFNGLA PG 	SAKRRKKN SAKRRKKN SAKRRKKN DGKRRKK C SAKRR C SAKR S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW YRGIRQRPW	/G K W A A /G K W A A
	DOMINIO	AP2	100	100	200
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2		FKTAEEAARAYD FNTAEEAARAYD FNTAEEAARAYD FNTAEEAARAYD	AAARRIRGS AEARRIRGK VAAKOIRGD EAAKRIRGD	KAKVNFPE KAKVNFPE KAKVNFPDE KAKUNFPDL KAKUNFARP	200

	210	2	20	230	240	250
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	NSOKR-SVKAN ASPKRAVNSMA PPPN-YTPPP ADTKPGG-NQP VPTQTQKSNHN VPTQTKHYNHN GSTQTQDYNHN VSQKRPSAKTN SSGKR-	- LQKPVAK SSPRSTDQ PAKKRCIS PAKKRCIS PPAIWNPA PLAISTPA NLQKSVAK		PNPSPALV QPNLSQNV	QN SN I SFEN YNYFNNLGQD QQYCNNSFDN	I I YYNTMV SFGDMS
	260	2	70	280	290	300
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	FMEEKHQVSNN FVDEKPQMN- - AKKVCVVSQS - UARASLQTTO PYQTQNPRANF LYQTQNRRANF LYQTQNRRANF CQTQNRRAF FMEEKPQMYNN QVEENHEADL	NNNQFGMTN QFASMT ESELSQPSI PPPPPAPA NSIDFEFG NSVGFGFG QFGLTI	II NS PASGN. FPVECIG VALQPVY YDLNQVG YDRNQV	A G V K P F V F	- CNGYQYFS SDNTHMYFS - FGNGDE - PRYHQVM - GSFSRN ACN	S DQGSN S DQGSN S DQGSN F QNLSY F GYGNE S T G FNE S T G FSE S DQGSN WEENNP
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	3100 SFDCSEFGWSE SFGCSEFGWGE GFEP-DYDLKC GYNPSENELKE SFDCSEFGWSE NHAANAMSNEA NHAANAMSNEA SFDCSEFGWSE DTLLTDTQWLE	QAPITPDI QATKTPEI QATKTPEI QUSSLESF QUWTLETLI LIS	20 SSAVINNN SSVLLDQPC LELDGNTAT LGDRDTAT SGTGTRSGS SGTGSSGS SGTGSSGS SSMLVNNT KKHEPNDST	330 NSALFFEE Q FVE E V S ECGYS SRSDCGYS S E - ASFVE E - ASFVE	340 ANPAKKLK- CNPEKKLKC SSPEFTGCN SSPEFTGRN TNAAKKLKP	350 S S E T M V
	360	3	70	380	390	400
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	P V Q G N A N K S L S	MDFETPYN BEELLAFDN QN QN BDLMAYLD BEELLAFEN	I I QMKYLQVPI SNNNGGVR CNNNCGVR - DYGGVR	· · · N T EWD/ H LDSNWDS · · · · · · · · · · · VKEEEQ. VKEEEQ. VKEEEQT - · NALWD1 QTEYFSQM	I I A S L D F L N S S L D	I T - SEDEEGUS A A P SSEDEEGUS CA A P SSEEEEGUS SE SSESSES SE SSESSES A A D SSESSES SE SSESSES SE SSESSES A A SSESSES SE SSES SE SSESSES SE SSES SE SSESSES SE SSESSE
	410	l	420	430	440	
AtRAP2.12 CpRAP2.12 AtRAP2.3 CpRAP2.3 AtHRE2 CpHRE2 CpHRE2-like2 CpHRE2-like1 AtRAP2.2 AtHRE1	QDNGANPMDL QDNGANPMDL EV	WSLDEINS WAFDDLPSL WMLDDVIAS WMLDDVVTH YQIPVADDC YQIPVADDC YQIPVADC YQIPVADC YQIPVLDC YQIPVLDC WSLDEINFW	1	VY	LWSFDDAPVT	SGAV

Figura 4.5. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de los ortólogos de ERF-VII de *A. thaliana* y *C. papaya.* Aminoácidos idénticos están sombreados en color negro, las sustituciones conservadas en color gris y los aminoácidos diferentes en blanco. Identificación del motivo N-terminal (azul) y AP2 (amarillo), así como las estructuras β -plegada (flecha amarilla) y la α -hélice (hélice azul). Se señalan (estrellas) los sitios utilizados para la clasificación como ERF-VII.

4.3.5 Identificación de motivos conservados

Se utilizó la herramienta en línea MEME (versión 5.5.7) para la localización de los motivos conservados en las secuencias (**Figura 4.6**). Se identificaron en total 9 motivos conservados, de los cuales el N-terminal o CMVII-1 (cian) y AP2/ERF (rojo) se localizaron en todas las secuencias, estos motivos son conservados en todos los miembros de los ERF-VII. En las secuencias AtRAP2.12 y CpRAP2.12, además de los motivos conservados, se localizaron los motivos CMVII-3, CMVII-5, CMVII-6, sin embargo, en CpRAP2.12 también se localizó el motivo CMVII-8. Tanto en AtRAP2.3 como CpRAP2.3 se localizaron los mismos motivos, los dos ya mencionados y CMVII-3, CMVII-4 y CMVII-6. En AtHRE2 se localizaron también CMVII-2, CMVII-6 y CMVII-8, mientras que en CpHRE2, CpHRE2-like1 se localizaron también CMVII-2, CMVII-5 y CMVII-8, los cuales también estuvieron presentes en CpHRE2-like2 con excepción del CMVII-8. AtHRE1 presentó los dos motivos principales y el CMVII-6, mientras que AtRAP2.2 presentó los motivos CMVII-4 y CMVII-6 además de los principales.



Figura 4.6. Motivos conservados en las secuencias de los FT ERF-VII de A. thaliana y C. papaya.

3.3.6 Diseño 3D de las proteínas ERF-VII de C. papaya

Utilizando el software AlphaFold 3 y Quimera X se diseñaron las estructuras 3D de cada una de las secuencias pertenecientes a *C. papaya* y *A. thaliana* (**Figura 4.7**) Las estructuras de las proteínas de RAP2.12, RAP2.3 y HRE2, pertenecientes a *A. thaliana*, poseen un dominio único AP2 caracterizado por la presencia de una α -hélice y tres β -plegadas. En el caso de las secuencias analizadas, obtenidas del genoma de *C. papaya*, se localizaron dichas estructuras del dominio AP2, necesario para la clasificación de ERF-VII. Con este análisis se corroboró la identidad de las secuencias y se descartaron las secuencias CpHRE2-like1 y CpHRE2-like2 por su corta longitud.



Figura 4.7. Estructura 3D de las proteínas RAP2.12, RAP2.3 y HRE2 de la familia ERF-VII de *A. thaliana* y sus homólogos identificados en el genoma de *C. papaya*. Se localizaron las estructuras β -plegadas (rojo), α -hélice (azul) y el motivo N-terminal (verde).

4.3.7 Diseño de iniciadores para los genes ERF-VII en C. papaya

Con ayuda de los softwares en línea RT-qPCR Primer & Probe Design Tool se obtuvieron cinco pares de primers candidatos para cada secuencia (**Tabla 4.4**). Cada uno de los juegos de primers fue probado en una PCR *in silico* en el genoma de *C. papaya* utilizando la base de datos en línea de NCBI con la herramienta Primer-BLAST. Se seleccionaron aquellas parejas de iniciadores que solo dieran como resultado un único producto de amplificación y que, además, tuvieran mayor número de pares de bases.

Gen	Forward	%GC	Tm	Reverse	%GC	Tm	bp
CpRAP2.1 2a	CCACCCAACT CAAACTTTCG	50	61.3	TGCACGACCGA GTAGTAGCG	60	65.4	121
CpRAP2.1 2b	CATACCCACC GCTACTACTC G	57	63.2	CAATATCGGAT TCGTCGTCC	50	60.1	169
CpRAP2.3 a	тссссстсттт стттстбтб	59	65.0	AAGACGTCGAG CTCAGACC	50	60.9	163
CpRAP2.3 b	GAAACGCTGC TGGGATTGGA	55	64.9	TGTTGCTGGTG ATGAGTCAC	60	62.3	134
CpHRE2a	AACGAGGTGC GGAAATTGTC	50	63.1	TATTCTGCGCC GGAGATTGT	50	63.8	100
CpHRE2b	GAGTGAGGGT GAAGGAAGAA GA	50	63.1	GCTCCACAGAT CACCCACCA	60	65.9	180

Tabla 4.4 Parejas de iniciadores diseñados para los genes ERF-VII de C. papaya

4.3.8 Expresión de genes ERF-VII en C. papaya en respuesta al anegamiento

4.3.8.1 Obtención de ARN

Se extrajo ARN íntegro y de buena calidad de los tejidos de hoja y raíz de los genotipos Maradol y silvestre de *C. papaya* donde se pueden observar tanto el ARNr 28S, como el ARNr 18S (**Figura 4.8**). De igual manera, se obtuvieron altos rendimientos de ARN de cada uno de los tejidos, así como cada uno de los tiempos (**Tabla 4.5**).



Figura 4.8. ARNr del tejido de hoja y raíz de dos genotipos de papaya Maradol y silvestre durante el estrés por anegamiento durante 0, 24, 48 y 72 h. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con Sybr Safe. De lado izquierdo se indican los ribosomales 28S y 18S

Tabla 4.5. Cuantificación de ARN (ng μ L⁻¹) y rendimiento de ARN por g de peso fresco (gPF) extraído de diferentes tejidos en los genotipos Maradol y silvestre bajo diferentes tiempos de anegamiento.

Genotipo	Tejido	Tratamiento	ng µL¹	ng gPF ⁻¹
Maradol	Hoja	0 h	178.1	17.81
		24 h	519.5	51.95
		48 h	624.8	62.48
		72 h	296.2	29.62
	Raíz	0 h	112.6	33.78
		24 h	231.4	69.42
		48 h	355.2	106.56
		72 h	225.6	67.68

Silvestre	Hoja	0 h	299.7	29.97
		24 h	373.7	37.37
		48 h	689.9	68.99
		72 h	280.6	28.06
	Raíz	0 h	241.6	72.48
		24 h	349.9	104.97
		48 h	302.4	90.72
		72 h	319.2	95.76

4.3.8.2 Amplificación de genes ERF-VII en C. papaya mediante PCR en punto final

En la amplificación de los genes CpRAP2.12, CpRAP2.3 y CpHRE2 en las muestras de *C. papaya* de ambos genotipos, en los tejidos de hoja y raíz se localizó un solo producto de amplificación de los tamaños esperados (**Figura 4.9**).



Figura 4.9 Producto de amplificación de los genes EF1α, CpRAP2.12, CpRAP2.3 y CpHRE2 en los tejidos de hoja y raíz de los genotipos Maradol y Silvestre durante 0, 24, 48 y 72 h en estrés por anegamiento. A la derecha se indica el peso de los amplicones. Visualización en gel de agarosa al 1.5%, teñido con Sybr Safe®.

Mientras que el gen EF1α, como se esperaba, no presentó diferencias en la intensidad de las bandas de amplificación entre los tratamientos y tejidos; en los demás genes si se presentaron diferencias, como resultado del efecto de los tratamientos. El gen CpRAP2.12 tuvo una expresión similar en todos los tratamientos de las hojas del genotipo Maradol. De manera similar, el genotipo silvestre no presentó cambios en la intensidad de las bandas a las 0, 24 y 48 h, sin embargo, a las 72 h bajo anegamiento no se observó la presencia de la banda de amplificación. Respecto a este mismo gen, las raíces del genotipo Maradol presentaron un aumento de intensidad de banda a las 24 h de anegamiento, a comparación de las 0 h. Sin embargo, a las 48 h no es apreciable la banda, mientras que, a las 72 h la amplificación fue similar a las 0 h de anegamiento. Por su parte, los amplificados de las raíces silvestres presentaron una intensidad de banda similar a las 0, 48 y 72 h en anegamiento, presentando un ligero aumento a las 24 h (**Figura 4.9**).

En el caso del gen CpRAP2.3, las hojas de ambos genotipos presentaron bandas muy tenues en todos los tratamientos de anegamiento. Sin embargo, para el tejido de raíz el genotipo Maradol presentó una banda tenue a las 0 h de anegamiento, la cual bajó de intensidad a las 24 h. las bandas de las 48 y 72 h en anegamiento no fueron observadas. De manera contrastante, el genotipo silvestre, aunque presentó una banda apenas observable a las 0 h de anegamiento, los tratamientos de 24, 48 y 72 h presentó bandas más nítidas, indicando un aumento constante en la expresión de este gen (**Figura 4.8**).

Para el gen CpHRE2 en las hojas, tanto del genotipo Maradol, como silvestre no se apreciaron cambios en la intensidad de las bandas en ninguno de los tratamientos. Mientras que, en las raíces si hubo diferencia entre los genotipos, donde Maradol presentó una banda tenue a las 0 h en tratamiento, la cual no fue observada en los tratamientos de 24 ni 48 h, mientras que fue observable, pero tenue, en el tratamiento de 72 h en anegamiento. Los amplificados del genotipo silvestre fueron tenues en las 0, 24 y 48 h de anegamiento, sin embargo, no hubo presencia de amplificación a las 72 h de tratamiento.

4.3.8.3 Validación de iniciadores para amplificación en RT-qPCR

Concordante a lo observado en PCR punto final, se observó un producto único de amplificación en el gen CpRAP2.12 (**Figura 4.10a**), así como sensibilidad al cambio de concentración en su curva estándar (**Figura 4.10b**). De igual manera, el gen CpRAP2.3 mostró un solo producto de amplificación (**Figura 4.10c**), con una curva estándar sensible a las tres concentraciones (**Figura 4.10d**). Finalmente, el gen CpHRE2 presentó tanto un producto único de amplificación (**Figura 4.10f**), como una curva estándar sensible al cambio de concentración (**Figura 4.10f**).



Figura 4.10. Curva Melt y Curva estándar de concentración de los iniciadores de los genes CpRAP2.12 (a, b), CpRAP2.3 (c, d) y CpHRE2 (e, f).

4.3.8.4 Expresión Relativa de genes ERF-VII

Utilizando los resultados obtenidos de las amplificaciones en PCR punto final de los genes CpRAP2.12, CpRAP2.3 y CpHRE2 se seleccionó el gen CpRAP2.3 para su análisis mediante RT-qPCR en las hojas en todos los tratamientos, mientras que los genes CpRAP2.12, CpRAP2.3 y CpHRE2 fueron evaluados de la misma manera en el tejido de raíz mediante RT-qPCR.

En los resultados del gen CpRAP2.3 analizados en hojas no se observó ninguna diferencia en los niveles de expresión relativa (REL) entre los genotipos ante anegamiento (**Figura 4.11**). Algo que resulta interesante es observar que este gen se encontraba expresado de forma importante en ambos genotipos en el momento previo al anegamiento (0 h), sin embargo, en ambos genotipos la expresión de este gen fue reprimida en respuesta al estrés, respuesta que se observa claramente desde las primeras 24 h de anegamiento y se mantiene hasta las 72 h.



Figura 4.11. Niveles de Expresión Relativa (REL) en hojas del gen CpRAP2.3 en *C. papaya*. Genotipos Maradol y silvestre en anegamiento durante 0, 24, 48 y 72 h en muestras de hoja. El gen CpEF1 α se utilizó como gen de referencia y los REL fueron estimados mediante el método 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}. La línea indica la media +/- la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística, p<0.05.

Sin embargo, en el caso de las raíces el resultado de la expresión relativa de los tres genes en estudio fue muy diferente al de las hojas. En primer lugar, el gen CpRAP2.12 mostró una expresión basal en ambos genotipos de papaya previo al anegamiento (0 h), la REL de dicho gen fue incrementando en ambos genotipos conforme pasaba el tiempo de la planta en anegamiento sin diferencia significativa entre genotipos (p<0.05), sin embargo, a las 72 h en tratamiento el genotipo silvestre mostró una clara diferencia en la REL respecto al genotipo

Maradol, demostrando que la respuesta de este gen, en el genotipo silvestre, no solo se mantiene a lo largo del tratamiento, sino que tiende a incrementar su expresión después de un tiempo prolongado de anegamiento (**Figura 4.12a**).

Con respecto al gen CpRAP2.3, éste muestra niveles de REL basales previo al anegamiento similares a las observadas en hojas para ambos genotipos, sin embargo, a diferencia de lo que se observó en las hojas, en raíces, este gen incrementa su expresión inducida por anegamiento, alcanzando su pico máximo a las 24 h sin diferencia significativa entre los genotipos (p>0.05). A las 48 h de anegamiento, el nivel de REL de este gen disminuye en ambos genotipos sin diferencia significativa (p>0.05). Sin embargo, para las 72 h de tratamiento, la expresión de CpRAP2.3 en el genotipo Maradol no solo se mantiene, sino que incrementa respecto a su expresión a las 48 h, a diferencia del genotipo silvestre en el que la REL disminuye respecto a las 48 h, generando que a las 72 h de anegamiento haya una mayor expresión del gen CpRAP2.3 en el genotipo Maradol que en el silvestre (**Figura 4.12b**).

Por último, para el gen CpHRE2 los resultados del ensayo de expresión mostraron que ambos genotipos tienen una expresión muy baja de este gen bajo condiciones de no anegamiento; sin embargo, después de 24 h de exposición al anegamiento, la expresión de este gen se induce alcanzando niveles de expresión muy altos (REL = 400) los cuales son mucho mayores que los alcanzados en los otros dos genes, en ambos genotipos. A las 48 h y 72h se observó un incremento en la expresión del gen CpHRE2 (REL = 600) en el genotipo Maradol, mientras que se mantuvo en valores REL cercanos a 200, en el genotipo Silvestre (**Figura 4.12c**).





Figura 4.12. Niveles de Expresión Relativa (REL) de los genes a) CpRAP2.12, b) CpRAP2.3 y c) CpHRE2 c) en raíces *C. papaya* genotipos Maradol y silvestre. El gen CpEF1 α se utilizó como gen de referencia y los REL fueron estimados mediante el método 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}. La línea indica la media +/- la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística, p<0.05.



4.4. DISCUSIÓN

El cultivo de papaya es uno de los de mayor importancia económica en la Península de Yucatán, lamentablemente, es altamente susceptible al estrés por condiciones ambientales adversas, tal como la sequía y las altas temperaturas. Sin embargo, los recientes eventos climatológicos que han causado importantes inundaciones en la región, incluidos los sitios de producción de papaya. Por lo tanto, se ha demostrado la importancia de comenzar a prestar atención al estrés por inundación y el anegamiento que se pudieran dar en este cultivo, ya que se sabe que puede llegar a ser devastador (Rodríguez et al., 2014).

Por lo anterior, es importante identificar elementos genéticos que pudieran estar involucrados en tolerar el anegamiento, tal como se ha hecho para la sequía (Estrella-Maldonado et al., 2021; Girón-Ramírez et al., 2021). A este respecto, la subfamilia ERF-VII, miembros de la superfamilia ERF ha sido identificada como crucial en la respuesta tolerante a inundación en *A. thaliana* (Gibbs, et al., 2015). En este capítulo, nos enfocamos en la búsqueda de homólogos de la familia AtERF-VII en el genoma de *C. papaya*.

El análisis BLAST, la subsecuente reconstrucción filogenética y la estructura tridimensional permitió identificar homólogos a los genes AtHRE2 y AtRAP2.3. Con relación al gen AtHRE2, ubicamos tres posibles homólogos, mas no se encontró un homólogo al gen AtHRE1. Este resultado es similar al caso de la especie Jatropha curcas, donde únicamente se encontró un homólogo a AtHRE2, pero no a AtHRE1; además, se observó que al sobre-expresar heterólogamente dicho gen en las raíces de A. thaliana, se indujo un alto nivel de tolerancia al anegamiento (Juntawong et al., 2020). El gen HRE2 ha sido claramente identificado como una parte necesaria para mantener el metabolismo anaeróbico en A. thaliana, mas no como activador del mismo (Giuntoli y Perata, 2018), además, se ha observado que la sobrexpresión de AtHRE1 es la que incrementa genes relacionados con la hipoxia como las enzimas fermentativas, mientras que AtHRE2 tiene una función parcialmente redundante a AtHRE1 (Licausi et al., 2010), por lo cual se considera que su sola actividad no podría activar la tolerancia completa al anegamiento. La presencia de tres genes asociados a AtHRE2 en el genoma de C. papaya sugiere que existen mecanismos parciales necesarios para mantener activo el metabolismo anaeróbico en condiciones de anegamiento. Además, en nuestro ensayo de expresión de este gen, CpHRE2 mostró claramente que su expresión incrementa a lo largo del tiempo que pasa la planta bajo anegamiento, sin embargo, su expresión es mayor en el genotipo Maradol que en el silvestre, lo que cual puede indicar un mecanismo diferente a la mayor tolerancia fisiológica del

genotipo silvestre (González-Oviedo et al., 2025). Aunque no existen muchos estudios sobre el papel que el gen HRE2 tiene en la respuesta de tolerancia hacia el anegamiento, sí se ha reportado que el papel que este gen tiene no es tan importante como su similar, HRE1 (Licausi et al., 2010), al contrario, se ha reportado que la acumulación de etileno en respuesta a la inundación o anegamiento activa la expresión de AtHRE1 lo que desencadena el metabolismo anaeróbico, pero no la expresión de AtHRE2 (Peña-Castro, 2014). Sin embargo, también se ha observado que el gen HRE2 puede ser activado por el coactivador transcripcional MBF1c en respuesta a la hipoxia generada por exceso de agua (Zhao et al., 2022), sin embargo, MBF1c puede ser activado por múltiples hormonas, además del etileno (Jaimes-Miranda et al., 2020).

Por otra parte, identificamos solo un homólogo del gen AtRAP2.3, el gen CpRAP2.3. Este gen ha sido identificado como parte de los principales activadores de la respuesta a la hipoxia en A. thaliana, sin embargo, de los tres genes tipo RAP2, el gen RAP2.3 es el gue menor tiene capacidad de activación de genes relacionados con hipoxia (Bui et al., 2015), sin embargo, la actividad de los tres genes parece ser redundante ante diferentes tipos de estrés y prolonga la respuesta al estrés activada por ácido abscísico (Padpi et al., 2015), de los cuales, AtRAP2.3 mantiene una expresión constitutiva, mientras que los otros dos genes se activan en respuesta a la hipoxia (Gasch et al., 2016). Asimismo, existe evidencia de que la proteína codificada por AtRAP2.3 interactúa físicamente con la proteína codificada por el gen ORA59 (Octadecanoidresponsive arabidopsis 59) para entrar en el núcleo ante diferentes tipos de estrés. Además, se ha reportado que la sobre expresión del gen StRAP2.3 se relaciona directamente con el incremento de tolerancia al estrés por frío en Solanum tuberosum (Shi et al., 2021). Por otro lado, recientemente se concluyó que AtRAP2.3 se relaciona con el óxido nítrico (ON), cuya acumulación genera la degradación de los ERF-VII, actuando como un represor de la biosíntesis de ON y por tanto permitiendo la estabilización de las respuestas no dependientes de ON (León et al., 2020). Nuestros resultados sugieren que, la alta susceptibilidad de C. papaya al anegamiento, que ya ha sido reportada anteriormente por Rodríguez et al. (2014), podría estar vinculada a la presencia de solo un ortólogo de los genes AtRAP2 en su genoma, el de menor capacidad de activación de metabolismo anaeróbico, sin embargo, es necesario estudiar su nivel de expresión bajo este estrés abiótico. Además, es relevante también estudiar el nivel de expresión del gen CpRAP2.3 en diferentes genotipos de C. papaya resistentes a seguía (Estrella-Maldonado et al., 2021), pues se ha reportado, en otras especies, que genotipos con resistencia a la seguía muestran altos niveles de tolerancia a la inundación y una buena respuesta a la reoxigenación posterior (Toral-Juárez et al., 2021). En los ensayos de expresión, se observó que

la expresión del gen CpRAP2.3 incrementó en ambos genotipos en respuesta al anegamiento, sin embargo, en el genotipo silvestre la expresión mostró un pico a las 24 h y disminuyó a mayores tiempos de anegamiento, mientras que en el genotipo Maradol la expresión fue incrementando con el tiempo, hasta las 72 h de anegamiento. El gen RAP2.3 de kiwi (*Actinidia deliciosa*) al ser sobre expresado en raíces de tabaco inducen una alta tolerancia a la inundación mediante incrementar la actividad de las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (Pan et al., 2019). Recientemente, se observó experimentalmente que la sobre-expresión del gen RAP2.3 induce un incremento en la tolerancia al anegamiento en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*), la expresión de este gen es activado por la expresión de otro factor de respuesta a etileno, el gen CmERF5, los cuales en conjunto disminuyen la cantidad de ROS (Li et al., 2023). El gen CpERF5 en *C. papaya* ha sido descrito previamente por ser expresado constitutivamente en tejido vegetativo y reproductivo (Vallejo-Reyna et al., 2015).

Por último, se identificó un homólogo al gen AtRAP2.12 en el genoma de *C. papaya*, el cual se consideró como CpRAP2.12. Los ensayos de expresión mostraron que este fue el único gen que se expresó en mayor cantidad en el genotipo silvestre de papaya, especialmente a las 72 h de anegamiento. Se ha descrito en *A. thaliana* que existe una regulación negativa entre el gen AtHRE1 y AtRAP2.12 (Giuntoli et al., 2014). Además, el gen AtRAP2.12 se ha reportado experimentalmente como un sensor de oxígeno indispensable durante condiciones de normoxia (cantidades normales de oxígeno) e hipoxia (Paul et al., 2016). Por lo tanto, el hecho de que *C. papaya* no cuente con un homólogo de AtHRE1 y que sea el genotipo silvestre, más resiliente al anegamiento, el que muestre mayor expresión del gen CpRAP2.12, sugiere que este gen juega un papel importante en la respuesta a la hipoxia por anegamiento en *C. papaya*. El papel que el gen AtRAP2.12 juega en la colonización de ambientes con diferentes niveles de humedad en poblaciones silvestres de *A. thaliana* ha sido asociado con variaciones en la región promotora del mismo (Lou et al., 2022).

Los análisis filogenéticos y moleculares mostraron una gran similitud entre el gen CpRAP2.2 y el gen CpRAP2.12. Al respecto, se ha reportado que para la respuesta a la hipoxia en *A. thaliana* mediada por el gen AtRAP2.2 los genes WRKY33 y WRKY12 juegan un papel imprescindible en su expresión (Tang et al., 2021). Estos dos genes han sido ya descritos en el genoma de *C. papaya* y se ha demostrado que tiene un papel en la respuesta del genotipo silvestre al estrés por falta de agua (Arroyo-Álvarez et al., 2023), lo que podría sugerir que estos genes jueguen un papel importante en la mayor expresión del gen CpRAP2.12 en condiciones de anegamiento.

Aunque también, la expresión del gen AtRAP2.12 ha sido asociada a la interacción de los genes ACYL-CoA-BINDING PROTEIN 4 (ACBP4)-WRKY70 (Guo et al., 2024), lo que sugiere que la expresión al alza de CpRAP2.12 en condiciones de hipoxia por anegamiento podría estar cercanamente asociada a la expresión previa de otros FT, como los WRKY y otros menos estudiados como los ACBP y otros múltiples reguladores (Gibss et al., 2025).

Por lo tanto, debido a la mayor resiliencia del genotipo silvestre al anegamiento y la expresión al alza del gen CpRAP2.12 en respuesta a la hipoxia generada por el anegamiento, podemos suponer que este gen ERF-VII juega un papel importante en la respuesta al anegamiento del genotipo silvestre.

4.5 CONCLUSIONES

- 1. El análisis bioinformático permitió identificar que existen al menos cinco genes pertenecientes a la sub familia ERF-VII en el genoma de *C. papaya,* asociados a la tolerancia al estrés por hipoxia inducido por anegamiento.
- Se identificaron homólogos a los genes AtRAP2.3, AtRAP2.12 y AtHRE2, de este último se identificaron al menos tres posibles homólogos, por lo cual se seleccionó aquel con mayor nivel de similitud molecular, basado en las filogenias, alineamientos, identificación de motivos y estructuras 3D de las proteínas.
- 3. Se analizó la expresión del gen CpRAP2.3 en hojas de los dos genotipos de papaya en estudio, Maradol y silvestre. Se observó que existe una expresión constitutiva de este gen en las hojas, sin embargo, esta expresión se reprime fuertemente durante el tiempo que dura el estrés por anegamiento.
- 4. El análisis de expresión de los genes ERF-VII en las raíces de los dos genotipos permitió identificar que los genes CpRAP2.3 y CpHRE2 muestran un mayor nivel de expresión a las 72 h en el genotipo Maradol, sin embargo, el gen CpRAP2.12 muestra expresión al alza, mayor en el genotipo silvestre que en Maradol, lo que sugiere que la mayor resiliencia del genotipo silvestre al anegamiento podría estar mediado por este gen.

PRODUCCIÓN DE ETILENO EN DOS GENOTIPOS DE Carica papaya BAJO ESTRÉS POR ANEGAMIENTO

5.1 INTRODUCCIÓN

El anegamiento de suelos ocurre cuando los espacios vacíos del suelo son sustituidos por agua, lo que trae como consecuencia que las raíces de las plantas sufran una importante disminución del oxígeno disponible, lo que las lleva a un estado de estrés por hipoxia considerable (Manghwar et al., 2024). Es por esto que, las plantas han desarrollado mecanismos importantes para poder contrarrestar dicha hipoxia, entre los cuales, la producción de etileno es uno de los principales (Ullah et al., 2024). Esto se debe a una gran acumulación de etileno en el tejido que, aunado a la deficiencia de oxígeno, permite la estabilización de proteínas de la familia ERF-VII, las cuales, al migrar al núcleo, activan numerosas respuestas fisiológicas, morfológicas y metabólicas que permiten a las plantas contrarrestar los daños ocasionados por la hipoxia (van Veen et al., 2025).

El etileno es una hormona gaseosa que se sintetiza a partir de una ruta enzimática simple: después de pasar de metionina a S-adenosil-L-metionina (SAM), por la enzima SAM-sintasa; la SAM se convierte a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) por la ACC-sintasa, por último, ACC es convertido en etileno por la ACC-oxidasa (ACO) (**Figura 5.1**). Este último paso es de gran importancia en la limitación de la producción de etileno en las plantas (Houben y Van de Poel, 2019), por el importante papel de la enzima ACO. Lo práctico de esta ruta de biosíntesis permite que el etileno sea sintetizado en cualquier órgano de planta y en lapsos de tiempo muy cortos (Balagueral-López et al., 2014), lo que es fundamental en la respuesta a diferentes tipos de estrés, como son de índole biótico o abiótico, como es el caso de la deficiencia de oxígeno, donde la planta debe reaccionar inmediatamente para sobrevivir.

Para el caso específico de la papaya (*C. papaya*), existen numerosos estudios enfocados en el papel del etileno en la maduración del fruto (Fabi y Bernardino-do Prado et al., 2019; Chan-León et al., 2023), sin embargo, es poco lo que se ha reportado sobre la producción y el papel del etileno durante otras funciones fisiológicas, como la respuesta ante el estrés abiótico.
Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue cuantificar la producción de etileno foliar en dos genotipos de papaya, Maradol y silvestre, durante hipoxia inducida por anegamiento, así como determinar la expresión del gen ACO durante el anegamiento en estos dos genotipos.



Figura 5.1. Ruta de biosíntesis de etileno en plantas. Tomado de Houben y van de Poel (2019).

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Cuantificación de etileno foliar en dos genotipos de papaya bajo anegamiento

5.2.1.1 Material Vegetal

Se pusieron a germinar semillas certificadas de papaya Maradol y semillas provenientes de plantas silvestres de papayas, recolectadas previamente (Cap. III). Las semillas y plántulas llevaron el mismo tratamiento de germinación, crecimiento y fertilización que se mencionan el Capítulo III. El experimento se llevó a cabo cuando las plantas tuvieron 60 días.

5.2.1.2 Diseño Experimental

Mediante un diseño experimental completamente al azar y con tres repeticiones, se llevó a cabo el experimento de anegamiento y determinación de la producción de etileno en las plantas de papaya Maradol y silvestre. Las plantas control fueron aquellas que se mantuvieron en óptimas condiciones y drenaje. Mientras que, las plantas tratamiento se fijaron al fondo de macetas de plástico de 10 L, sin orificios de salida, y se llenaron con 6 L de agua purificada (**Figura 5.2**),

repitiendo el ensayo de anegamiento del Cap. II y III. El anegamiento se mantuvo por 72 h, pasado este tiempo se tomaron muestras para los ensayos de producción de etileno.



Figura 5.2. Diagrama de los tratamientos del ensayo de anegamiento. Se utilizaron tres plantas control y tres plantas en anegamiento por 72 h para cada genotipo. Hecho en BioRender.com

5.2.1.3 Captura de Etileno

Se determinó la producción de etileno de las hojas de papaya con ayuda de una caja de acrílico de 15x10x15 cm, acondicionada con dos ventiladores internos, un septa y un sello acojinado para no lastimar el peciolo de la hoja (**Figura 5.3**). Para la colecta del etileno se utilizó una jeringa de 10 mL, con una llave de tres vías y viales de vidrio de 2.5 mL para HPLC.

La toma de muestras consistió en colocar una hoja dentro de la caja de acrílico, sellarla y dejarla dentro por 24 h. Pasado este tiempo, se insertó la jeringa en el septo, se abrió la llave de paso, se bombeó el aire 5 veces y se cerró la llave de paso. Finalmente, se inyectaron los 10 mL en un vial, dejando escapar los primeros 5 mL para reemplazar el aire contenido e inyectando el resto.

En un Cromatógrafo de Gases Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EEUU), y con ayuda de una jeringa Headspace de 1 mL (Calibre 26, punta no. 5, Hamilton), se inyectó 1 mL de las muestras recolectadas en los viales. Se tomaron tres réplicas técnicas por cada muestra biológica de cada tratamiento, dando un total de 36 muestras analizadas. El cromatógrafo de gases estaba equipado con un detector de ionización de flama (FID, programado a tasa de flujo de aire = 700 mL min⁻¹) y una columna GS-Q (30 m x 0.53 mm i.d., J&W Scientific CA, USA). Las condiciones de corrida fueron 120°C en el inyector, 80°C temperatura isotérmica en la columna y 210°C en el detector FID. Se utilizó Nitrógeno como gas acarreador, con un flujo de 0.50 mL s⁻¹, en inyección sin división (tipo splitless). El área bajo la curva, de los cromatogramas obtenidos, se utilizó para determinar las concentraciones de etileno a partir de una curva estándar realizada con anterioridad utilizando etileno al 99.5% de pureza. Se utilizó la aplicación móvil PETIOLE PRO para determinar el área foliar de cada hoja que se colocó dentro de la caja de acrílico.



Figura 5.3. Caja de acrílico utilizada para capturar etileno. A) Caja de acrílico, B) Septa, C) Ventiladores, D) Sello acojinado, E) Soporte

5.2.2 Expresión del gen ACO en dos genotipos de papaya bajo anegamiento

5.2.2.1 Material vegetal

Se estableció un experimento de anegamiento utilizando dos genotipos de papaya, uno comercial (Maradol) y uno silvestre. Los detalles experimentales se describen en el Cap. IV. Se obtuvieron muestras de tejido foliar a las 0 y 72 h de anegamiento, los cuales se congelaron inmediatamente para preservarlos. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN total, tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA de acuerdo al protocolo descrito en el Cap. IV.

5.2.2.2 Ensayos de expresión

Para realizar la amplificación del gen ACO de ambos genotipos de C. papaya se utilizaron los (5'-ACAAGAGCGTGGAGCACAGAGT-3') (5'iniciadores ACO1-F ٧ ACO1-R TTTCGGGTACGCTGTTTTCTTCT-3'), diseñados y sintetizados por Chan-León et al. (2023). Se realizó la cuantificación de la expresión relativa en tiempo real del gen CpACO para lo cual se utilizó las siguientes condiciones de reacción: Sybr Green Master Mix 2x (Applied Biosystems), 5 µM de cada iniciador y 300 ng de ADNc a un volumen final de 10 µL. El programa térmico consistió en: desnaturalización inicial a 50°C por 2 min, seguido de 2 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 3 s y anillamiento a 62° por 30 s, siendo en este último punto donde se cuantificó la fluorescencia. Posterior al programa de ciclado se realizó una curva Melt de 60°C a 95°C. Se utilizó como gen normalizador de expresión endógena el gen EF1a (Estrella-Maldonado, 2017). El nivel de expresión relativa (REL) se determinó mediante el método 2-ΔΔCt y se realizó un análisis estadístico mediante una t-student bilateral, en el software R v.4.3.2. De igual manera se llevó a cabo un análisis semicuantitativo por RT-qPCR, utilizando los protocolos descritos en el Capítulo IV.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Cuantificación de etileno foliar en dos genotipos de papaya bajo anegamiento

5.3.1.1 Curva estándar

Se llevó a cabo una curva estándar (**Figura 5.4**) para relacionar el área bajo la curva, de los picos de los cromatogramas, con los µmoles de etileno producidos, utilizando cuatro cantidades diferentes de µmoles (2.8, 2.1, 1.4 y 0.7), con tres repeticiones cada una.



Figura 5.4. Regresión lineal del área bajo la curva y la cantidad de µmoles (0.7, 1.4, 2.1, 2.8) de etileno. Ecuación: y = 413856x + 245496, $R^2 = 0.9574$

La cantidad de moles más alta (2.82 µmoles) un tiempo de retención (RT) 7.12 min y área bajo la curva de 1333123, el pico de 2.12 µmoles se presentó a los 7.11 min con área bajo la curva de 959425; las últimas concentraciones, correspondientes a 1.41 y 0.70 µmoles, presentaron un solo pico a los 7.11 y 7.10 min, con área bajo la curva de 432505 y 708306 respectivamente, cabe mencionar que se detectó un pico único de etileno (**Figura 5.5**). Cada punto se corrió por triplicado y se utilizaron en la regresión lineal y la R^2 , para poder relacionar el área bajo la curva, con la cantidad de moles de las muestras. Finalmente, la gráfica obtenida se muestra en la **Figura 5.4**, obteniendo una $R^2 = 0.9115$, así como una función dada por y = 413856x + 245496. La función se utilizó para calcular los µmoles de etileno producidos por las hojas según el área bajo la curva de los cromatogramas resultantes.



Figura 5.5. Cromatogramas unificados de las diferentes cantidades de etileno (µmoles). Estándar al 99.5% de etileno en un tiempo de retención de 7.126 min

5.3.1.2 Producción de etileno

Se determinó la cantidad de etileno producida las plantas silvestres y Maradol a las 72 h en anegamiento y en plantas sin anegamiento (control) mediante cromatografía de gases. Las condiciones de corrida permitieron identificar los picos esperados en todas las muestras controles y anegadas de ambos genotipos cerca del minuto 7 (**Figura 5.6**). En todas las muestras, cerca de los 6 min, se detectaron dos picos pequeños no cuantificables que podrían ser otros compuestos que producen las plantas, se descartó que fueran etileno por no coincidir con el RT obtenido en la curva de calibración (7.10 min). Además, los controles de ambos genotipos presentaron un pico cuantificable cercano al RT esperado, siendo de 7.10 min en el genotipo Maradol (**Figura 5.6a**) y 7.12 en el genotipo silvestre (**Figura 5.6b**) con un área bajo la curva en promedio de 150069.25 u y de 146449 u respectivamente. En los tratamientos de anegamiento el genotipo Maradol presentó un pico en el minuto 7.10 (**Figura 5.6c**), con un área bajo la curva de 223171.3 u, mientras que el genotipo silvestre arrojó un pico en el mismo RT con un área bajo la curva de 1483036.75 u (**Figura 5.6d**).



Figura 5.6. Cromatogramas de las muestras foliares de *C. papaya* bajo estrés por anegamiento. a) Control Maradol, b) Control silvestre, c) Anegamiento por 72 h Maradol y d) Anegamiento por 72 h silvestre.

Con los datos de área bajo la curva, arrojados en los cromatogramas, y la curva estándar realizada anteriormente, se calcularon los µmoles de etileno producidos por cm⁻² en cada uno de los tratamientos. El control del genotipo Maradol produjo 0.0637 µmoles de etileno, por su parte, en anegamiento produjo 0.1092 µmoles de etileno, sin embargo, no se presentó diferencia estadística (p<0.05). De manera contrastante, el control del genotipo silvestre generó 0.0668 µmoles de etileno, mientras que, después de 72 h en anegamiento, produjo 1.1132 µmoles, con diferencia estadística (p<0.05) (**Figura 5.7**). De esta manera el genotipo silvestre generó más etileno que el genotipo Maradol (p<0.05) en respuesta al anegamiento por 72 h.



Figura 5.7 Concentración de etileno (µmoles producidos por cm⁻² de área foliar) encontraso alas 72h de anegamiento de dos genotipos de *C. papaya*, Maradol y silvestre. Las barras indican la media +/- la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística, p<0.05.

5.3.2 Expresión del gen ACO en dos genotipos de papaya bajo estrés por anegamiento

Se analizó la expresión del gen ACO a las 72 h de estrés por anegamiento en el genotipo Maradol y un genotipo silvestre de *C. papaya*, tanto por RT-PCR punto final como por RT-qPCR.

Se observó un único producto de amplificación del gen ACO en todas las muestras de plantas de *C. papaya* (**Figura 5.8**), el cual fue del tamaño esperado (150 bp). Se pudieron observar diferencias en la intensidad de banda de las hojas, el caso del genotipo Maradol presentó un aumento de la intensidad de banda a las 24 y 48 h de anegamiento, comparado con las 0 h, sin embargo, a las 72 h no fue visible la banda. Por otro lado, el genotipo silvestre presentó la banda de amplificación a las 0 h de anegamiento, la cual aumentó a las 24 h y se mantuvo a la misma intensidad a las 48 y 72 h de anegamiento.

En cambio, en las raíces del genotipo Maradol, aunque si hay presencia de una banda observable a las 0 h, su intensidad fue menor a las 24 h, mientras que no fue observable en los tratamientos a las 48 y 72 h. Por su parte, el genotipo silvestre presentó bandas tenues apenas identificables, con intensidades similares entre ellas, en todos los tiempos de anegamiento.

Con estos resultados se seleccionó a la hoja, en el tratamiento de 72 h de anegamiento para el análisis por RT-qPCR del gen ACO.



Figura 5.8 Producto de amplificación del gen ACO. Visualizados en gel de agarosa al 1.5%, teñido con Sybr Safe® de los tejidos de hoja y raíz de los genotipos Maradol y Silvestre durante 0, 24, 48 y 72 h en estrés por anegamiento. Se observa el peso del amplicón al lado derecho del gel.

5.3.2.1 Amplificación en RT-qPCR del gen ACO

De acuerdo con lo observado en la amplificación por PCR punto final del gen ACO, la curva Melt presentó un solo producto de amplificación (**Figura 5.9a**), así como una respuesta sensible al cambio de concentración, utilizada para realizar la curva estándar (**Figura 5.9b**).

Al realizar el ensayo de expresión del gen ACO en hojas de *C. papaya* silvestre y Maradol, se observó que previo al anegamiento la expresión de este gen en ambos genotipos fue estadísticamente similar (p>0.05), sin embargo, posterior a 72 h de anegamiento, la expresión del gen ACO en el genotipo Maradol se mantiene similar al control, a diferencia del genotipo silvestre, el cual muestra un incremento respecto al control sin anegamiento (p<0.05) (**Figura 5.10**).



Figura 5.9. Curva Melt y Curva estándar de los iniciadores del gen ACO en C. papaya.



Figura 5.10. Niveles de Expresión Relativa (REL) del gen ACO en dos genotipos de papaya medido a las 72 h bajo condiciones de anegamiento. Las barras indican la media +/- desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

5.4 DISCUSIÓN

Al encontrarse en condiciones de suelos anegados, las plantas entran en un estado de insuficiencia de oxígeno, el cual puede ir desde la hipoxia hasta la anoxia (Timilsina et al., 2022). Una de las principales respuestas de la planta a la inundación o anegamiento, y la consecuente falta de oxígeno en las raíces es el censado del oxígeno mediante moléculas especializadas como las PCO (Taylor-Kearny et al., 2022). Una vez que se alcanza niveles de ausencia de oxígeno, la planta debe cambiar de la respiración mitocondrial y fijación de carbono al metabolismo anaeróbico y fermentación para poder producir energía (Sasidharan et al., 2018). Este cambio en el metabolismo ocasiona que la planta comience a producir y acumular etileno, lo que induce la estabilización de ERF-VII y permiten la expresión de genes de respuesta a la hipoxia (Ugalde, 2022).

En el capítulo III de la presente tesis se mostró que el genotipo silvestre de *C. papaya* es más resiliente al anegamiento que el genotipo Maradol, lo cual se observó especialmente en la dinámica del PSII y la estabilidad de la membrana del genotipo silvestre (González-Oviedo et al., 2025b). Aunado a lo anterior, en el capítulo IV se observó que en el genotipo silvestre el gen CpRAP2.12 tiene una mayor expresión relativa en comparación al genotipo Maradol, lo que podría estar asociado a su mayor resiliencia. En el presente capítulo se observó que existe una clara diferencia en la producción y acumulación de etileno en el genotipo silvestre a las 72 h en anegamiento, lo cual explicaría la mayor expresión del gen CpRAP2.12 en *C. papaya* silvestre respecto al genotipo Maradol. Este fenómeno en que la acumulación de etileno se asocia a tolerancia a la inundación ha sido reportado en otras plantas como maíz (Geng et al., 2023), soya (Leeggangers et al., 2023) y *A. thaliana* (Liu et al., 2022), entre otras.

Asimismo, se determinó la expresión del gen ACO (que codifica a la enzima involucrada en la biosintesis de etileno) entre ambos genotipos de papaya a las 0 y 72 h en anegamiento. Los resultados muestran que, posterior al periodo de anegamiento, el genotipo Maradol reprime por completo la expresión del gen ACO, mientras que el genotipo silvestre mantiene su expresión. A pesar de que la ruta de biosíntesis de etileno en las plantas es muy sencilla, compuesta solamente por dos enzimas: la ACC sintasa (ACCs) y la ACC oxidasa (ACO), la regulación de la expresión y la estabilidad postraduccional de estas enzimas es complejo (Pattyn et al., 2021). En papaya, se ha descrito la presencia de dos copias ortólogas del gen ACO (CpACCo1 y CpACCo2), la expresión de los cuales se correlacionan directamente con la producción de etileno durante la maduración de los frutos (Chan-León et al., 2023). Estos resultados demuestran

claramente que la mayor resiliencia al anegamiento del genotipo silvestre (descrita en el capítulo III) y la expresión al alza del gen CpRAP2.12 del genotipo silvestre (en el capítulo IV), parecen estar asociadas a la capacidad de este genotipo de inducir el gen ACO y producir etileno en respuesta a anegamiento.

5.5 CONCLUSIONES

Una de las diferencias más relevantes, al comparar la respuesta del genotipo silvestre y Maradol de *C. papaya* durante el estrés por anegamiento, fue la producción y acumulación de etileno. En este sentido, el genotipo Maradol al no inducir la activación del gen ACO después de 72 h en anegamiento no se produjo suficiente etileno foliar para su detección, en cambio, en el mismo tratamiento, el genotipo silvestre al presentar una mayor actividad de este gen, tuvo como consecuencia una mayor cantidad de etileno sintetizado. Tomando en cuenta los parámetros fisiológicos y los genes de respuesta a etileno, estudiados en los capítulos anteriores, podemos concluir que el etileno lleva a cabo un papel relevante en la respuesta más tolerante durante el estrés por anegamiento en el genotipo silvestre de *C. papaya* que en el genotipo Maradol.

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

6.1 DISCUSIÓN

El cambio climático global ha traído consigo alteraciones a las precipitaciones a escala mundial (Abbass et al., 2022). Generalmente se asocia dicha alteración con la ausencia de lluvias, causando problemas de estiaje y sequía en muchas regiones de producción agrícola, lo que termina impactando fuertemente en la producción (Riedesel et al., 2024). Sin embargo, en otras regiones, como en la Península de Yucatán, las alteraciones pluviales han generado lluvias excesivas, generando que la cantidad de agua que llega al suelo sea mayor que la capacidad de infiltración del mismo, ocasionando inundaciones en suelos agrícolas (Tabari et al., 2020).

La inundación y anegamiento en suelos agrícolas ocasiona que disminuya la cantidad de oxígeno presente y disponible en el suelo, ocasionando que la planta entre en una deficiencia de oxígeno que puede ir desde hipoxia (bajas concentraciones de oxígeno) hasta la anoxia (ausencia total de oxígeno) (Striker, 2012). Los mecanismos fisiológicos y moleculares de la respuesta de las plantas, a la deficiencia de oxígeno, muestran variaciones importantes entre plantas. Estas respuestas van desde la formación de estructuras especializadas como los aerénquimas en el arroz (Yamauchi et al., 2013) hasta la activación del metabolismo anaeróbico (Loreti et al., 2017). Sin embargo, en general, los mecanismos de respuesta a la hipoxia por inundación se asocian a la producción de etileno por la planta y la expresión de los ERF-VII (Loreti y Perata, 2017).

Previamente se ha reportado que genotipos de plantas con un alto nivel de tolerancia a la sequía pueden presentar un importante nivel de tolerancia a la hipoxia por inundación (Toral-Juárez et al., 2021). Esto resulta interesante ya que, para el cultivo de papaya, se ha observado que genotipos silvestres colectados en la Península de Yucatán muestran un alto nivel de tolerancia a la sequía (Estrella Maldonado et al., 2021; Girón-Ramírez et al., 2021; Bautista-Bautista et al., 2024), por lo cual es importante conocer su respuesta ante el anegamiento, estrés ante el cual genotipos de papaya han sido reportados ser altamente susceptibles (Thani et al., 2016).

Con relación a lo anterior, en la presente tesis habíamos hipotetizado que el genotipo silvestre de *C. papaya* posee una respuesta fisiológica y molecular diferencial en respuesta al estrés por

anegamiento comparada con el genotipo Maradol, la cual se encuentra relacionada a los ERF-VII.

De manera que, en este trabajo, se evaluó la respuesta fisiológica de un genotipo silvestre de papaya y se comparó con su contraparte comercial. En el capítulo II, se describe la respuesta fisiológica del genotipo silvestre de papaya al anegamiento prolongada, mostrando que, a diferencia de lo que se ha reportado previamente en papaya comercial que muestra daños irreversibles a las 24 h en anegamiento (Thani et al., 2016), el genotipo silvestre alcanza su máximo daño hasta las 72 h en anegamiento. Lo cual se observó tanto en el ángulo de los peciolos, como en una mayor caída de hojas en el genotipo Maradol en comparación al genotipo silvestre.

En el capítulo III, se demuestra claramente que el genotipo silvestre de papaya tiene una respuesta fisiológica diferencial respecto a papaya Maradol. Especialmente se observa en relación a la estabilidad de la membrana, pues la fuga de electrolitos fue estadísticamente menor en el genotipo silvestre respecto a Maradol, lo cual ha sido reportado previamente como una característica asociada a la tolerancia a la inundación en plantas (Rajendran et al., 2025). Por otro lado, el genotipo silvestre muestra una mayor estabilidad en variables del PSII como el valor de Fv/Fm y las curvas OJIP (Estrella-Maldonado et al., 2021; Girón-Ramírez et al., 2021; Bautista-Bautista 2024). El PSII es especialmente sensible ante el estrés abiótico en plantas (Chauhan et al., 2023), en relación con el anegamiento, se ha reportado que genotipos con alta sensibilidad muestran rápidamente caídas en los valores de fluorescencia Fv/Fm (Sharma et al., 2022) y, por el contrario, la estabilidad de este valor puede funcionar como un marcador de tolerancia (Lin et al., 2022). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el capítulo III muestran que el genotipo silvestre tiene una mayor capacidad de tolerar y reponerse ante el estrés por anegamiento que el genotipo Maradol.

Debido a lo anterior, en el capítulo IV se determinó la presencia de genes de la subfamilia ERF-VII en el genoma de *C. papaya*, se caracterizaron molecularmente mediante diversas herramientas bioinformáticas y se determinó su nivel de expresión relativa en respuesta al anegamiento en los dos genotipos evaluados en el capítulo III. Los resultados del análisis mostraron la presencia de al menos cinco miembros de la subfamilia ERF-VII, de los cuales se identificaron homólogos a los genes AtRAP2.12, AtRAP2.3 y AtHRE2 de *A. thaliana*. Estos genes mostraron todas las características descritas para los ERF-VII, como el dominio AP2 y el N-

terminal (Giuntoli y Perata, 2017). Los análisis de motivos conservados y estructura tridimensional de las proteínas entre las obtenidas de *A. thaliana* y las aisladas de *C. papaya* muestran altos niveles de similitudes, confirmando la hipótesis de que son homólogos. El ensayo de expresión relativa de estos genes permitió observar comportamientos interesantes de estos genes durante el anegamiento. Por ejemplo, para el caso de los genes CpRAP2.3 y CpHRE2, se observó mayor nivel de expresión relativa en el genotipo Maradol, a pesar de que este es menos resiliente al anegamiento que el genotipo silvestre, sin embargo, reportes previos demostraron que la activación del gen CpHRE2 no necesariamente se asocia a la producción de etileno, ya que su regulación es diferente al gen CpHRE1, el cual no se identificó en papaya (Hess et al., 2011). Mientras que, el gen RAP2.3 sí se asocia con una mejor respuesta a la inundación en diferentes especies (Bai et al., 2019; Li et al., 2023), por lo cual, es necesario realizar análisis adicionales para comprender cuál es su función en papaya, por ejemplo, la interacción con otros ERF como ORA59 para poder activar genes de respuesta a la hipoxia (Kim et al., 2018) o regular la producción de NO (León et al., 2020).

Por último, el gen CpRAP2.12 mostró una expresión relativa mayor en el genotipo silvestre que en el genotipo Maradol. Este gen ha sido considerado como el principal sensor de oxígeno en *A. thaliana* (Paul et al., 2016). Además, se ha descrito que la interacción de RAP2.12 con los genes WRKY70 y ACBP4 inducen tolerancia de esta especie a la inundación (Guo et al., 2024). Es interesante resaltar que, de acuerdo con lo observado en el capítulo III, en el genotipo silvestre se observó mayor cantidad de oxígeno disuelto en el agua de anegamiento que en el genotipo Maradol, lo que podría estar asociado a una mayor expresión del gen CpRAP2.12. Por lo tanto, los resultados del capítulo IV de la presente tesis sugieren que la mayor resiliencia al anegamiento del genotipo silvestre de papaya podría estar asociado a la expresión de los genes CpRAP2.12.

Finalmente, los resultados de la cuantificación de etileno foliar entre ambos genotipos de papaya en respuesta al anegamiento en el capítulo V, demostraron que ambos genotipos mantienen una producción de etileno muy baja, apenas detectable mediante la cromatografía de gases, en condiciones normales. Sin embargo, posterior a 72 h de anegamiento, se observó claramente una producción diferencial entre ambos genotipos, siendo el genotipo silvestre el que muestra una mayor producción de etileno a comparación del genotipo Maradol. Este resultado es concordante con la expresión del ACO, el cual se observa sin diferencia previo al anegamiento entre ambos genotipos, mientras que, después de 72 h de anegamiento, el genotipo Maradol se

reprime por completo la expresión del gen, mientras que el genotipo silvestre se mantiene en niveles altos. Estos resultados son importantes para comprender los niveles de expresión de los ERF-VII descritos en el capítulo IV, pues la acumulación del etileno a las 72 h de anegamiento podría explicar la mayor expresión del gen CpRAP2.12 (Liang et al., 2019), así como la expresión del gen CpRAP2.3 (Kim et al., 2018). Además, aunque el gen CpHRE2 se muestra más expresado en el genotipo Maradol, el cual no acumula tanto etileno, se ha demostrado que la regulación de la expresión de este por gen por etileno no es tan directa como para el gen CpHRE1 (Hess et al., 2011).

6.2 CONCLUSIONES GENERALES

El estrés por anegamiento afecta fisiológica y molecularmente a *Carica papaya*, manifestando signos de estrés desde las primeras 24 h en el genotipo comercial Maradol, y en menor medida en el genotipo silvestre. Sin embargo, las plantas silvestres presentan una respuesta más tolerante en comparación con el genotipo Maradol, con menores afectaciones en parámetros fisiológicos clave, como la fotosíntesis, la conductancia estomática, eficiencia fotosintética y fuga de electrolitos, así como mayor concentración de oxígeno disponible en el agua de las macetas durante el anegamiento. Aunque la papaya silvestre también experimenta daños morfológicos, como la pérdida de hojas y epinastia acelerada, posiblemente relacionada con la acumulación de etileno, su capacidad de recuperación en términos de eficiencia fotosintética sugiere la existencia de mecanismos de resiliencia al estrés, en comparación con el genotipo Maradol, ya que, aunque ambos presentaron afectaciones, éstas fueron menores en el genotipo silvestre. Así mismo, los efectos en los parámetros fisiológicos durante el anegamiento, se correlacionaron en mayor medida con la disposición de oxígeno que con el potencial hídrico de las hojas en ambos genotipos.

Por su parte, el análisis molecular en el genoma de papaya permitió identificar al menos cinco genes pertenecientes a la subfamilia ERF-VII, los cuales están asociados a la respuesta a hipoxia inducida por anegamiento. En particular, se identificaron homólogos de AtRAP2.3, AtRAP2.12 y AtHRE2, observándose que la expresión de los genes CpRAP2.3 y CpHRE2 en las raíces muestran una mayor expresión en el genotipo Maradol. Por otro lado, la mayor expresión de CpRAP2.12 en el genotipo silvestre sugiere que este gen podría desempeñar un papel clave en la mayor tolerancia al estrés por anegamiento. Estas respuestas se encuentran fuertemente vinculadas a la síntesis de etileno, lo cual se observa en mayores niveles de expresión del gen precursor de etileno, ACO a las 72 h de anegamiento, únicamente en el genotipo silvestre. Asimismo, las plantas silvestres de papaya presentaron mayor acumulación de etileno que el genotipo Maradol. Se resumen lo anterior en el esquema de la **Figura 6.1**.

Por lo tanto, según nuestra pregunta de investigación la evidencia sugiere que, durante el estrés por anegamiento, el genotipo silvestre manifiesta mejor respuesta morfológica, fisiológica, en producción de etileno y expresión al alza de un gen tipo ERF-VII que el genotipo Maradol (**Figura 6.2**).



Figura 6.1 Esquema de la respuesta fisiológica y molecular del estrés por anegamiento en *C. papaya* genotipo silvestre. Durante el estrés por anegamiento se limita la disponibilidad de oxígeno dentro de las células, se conoce que esta condición puede generar un aumento de ROS, que daña los PSI y PSII, disminuyendo la fotosíntesis y aumentando la florescencia, así como posible daño en las membranas celulares, lo que genera fuga de electrolitos (mayor daño en membrana observado en el genotipo Maradol); además, las ROS generados por el estrés de anegamiento pueden inducir una cascada de señalización por MAPK, la cual induce la actividad de ACO, que es la enzima final de la ruta de biosíntesis de etileno (lo cual únicamente se observa en el genotipo silvestre, no en el Maradol). Es conocido que el etileno activa los receptores de etileno GCN2 e EIN3, ambos precursores de los ERF, que activan los RAP2.12, RAP 2.3 y HRE2. Estos genes, en sinergia con el etileno inducen el cierro estomático, disminuyendo la conductancia estomática y la transpiración, lo que permite la acumulación de CO₂ intercelular. Así mismo, la inducción del gen RAP2.12, observada en el genotipo silvestre, podría estar vinculada la protección de membranas y permitiendo la dosificación del oxígeno disponible en el agua para un estrés prolongado en este genotipo. Hecho en BioRender.com.



Figura 6.2. Esquema de la respuesta morfológica, fisiológica, de producción de etileno y expresión al alza del genotipo silvestre de *C. papaya* ante el estrés por anegamiento.

6.3 PERSPECTIVAS

La información obtenida en este trabajo nos permite sentar algunas bases para entender mejor la compleja respuesta de las plantas de papaya ante el anegamiento. Este estrés ha sido poco estudiado y este es el primer trabajo, a este nivel, en dicha especie, por lo que se abren muchas interrogantes al respecto, las cuales pueden servir para futuras investigaciones que sirvan para el eventual mejoramiento genético de esta especie, para afrontar las adversidades que puedan presentarse en un futuro cercano como consecuencia del cambio climático.

- Debido a que se consideraron tiempos de anegamiento prolongados, para el estudio de los parámetros fisiológicos y moleculares, es importante considerar en un estudio subsecuente su análisis desde los primeros minutos en que se llevó a cabo el estrés, hasta las primeras horas. Enfocándose en ensayos bioquímicos para la determinación de ROS, enzimas antioxidantes y algunos metabolitos identificados durante diferentes tipos de estrés como la prolina.
- Considerando que los resultados del experimento fisiológico, sugirieron que las plantas silvestres presentan mejores respuestas al anegamiento en algunos parámetros fisiológicos medidos en las hojas, es necesario estudiar nuevos parámetros en las raíces, como tasa de respiración, potencial hídrico, tasa de absorción de agua y producción de etileno, los cuales brindarán información más detallada sobre el movimiento del agua en la planta durante el estrés; así mismo, se pueden acompañar con estudios de microscopía óptica que permitan identificar los daños a nivel tejido durante el avance del anegamiento en las raíces a lo largo del tiempo.
- Ya que se ha estudiado que la respuesta al anegamiento puede provenir de diferentes rutas dentro de una misma planta, es relevante plantear un análisis transcriptómico durante el estrés por anegamiento, el cual brindará información relevante sobre qué otros genes se involucran en la respuesta a este estrés, y, considerando la respuesta diferencial entre los genotipos Maradol y silvestre, se podrán identificar más genes candidatos para el mejoramiento genético de variedades comerciales resilientes a anegamiento.
- Debido a los importantes roles que llevan a cabo los ERF-VII son necesarios estudios de sobreexpresión y edición génica.

6.4 REFERENCIAS

- Abbass, K., Qasim, M. Z., Song, H., Murshed, M., Mahmood, H., & Younis, I. (2022). A review of the global climate change impacts, adaptation, and sustainable mitigation measures. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(28), 42539–42559. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-022-19718-6</u>
- Alcántara-Jiménez, J.Á., Aguilar-Carpio, C., Leyva-Bautista, S., Alcántara-Nazario, Á.O. (2019). Rendimiento y rentabilidad de genotipos de papaya en función de la fertilización química, orgánica y biológica. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 575-584.
- Álvarez-Hernández J.C., Castillo-Martínez C.R. (2023). Comparing outstanding papaya lines for selecting and preserving improved characters. *AgroProductividad* 16: 71-88. https://doi.org/10.32854/agrop.v16i11.2725
- Arroyo-Álvarez E., Chan-León A., Girón-Ramírez A., Fuentes G., Estrella-Maldonado H., Santamaría J.M. (2023). Genome-Wide analysis of WRKY and NAC transcription factors in *Carica papaya* L. and their possible role in the loss of drought tolerance by recent cultivars through the domestication of their wild ancestors. *Plants* 12: 2775. https://doi.org/10.3390/plants12152775
- Ashraf, M. (2012). Waterlogging stress in plants: A review. *African Journal Of Agricultural Research.* 7. 1 <u>https://doi.org/0.5897/AJARX11.084</u>.
- Babalola, B.A., Akinwande, A.I., Otunba, A.A., Adebami, G.E., Babalola, O., Nwufo, C. (2024).
 Therapeutic benefits of *Carica papaya*: A review on its pharmacological activities and characterization of papain. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(1), 105369.
- Bai D.F, Li Z, Hu C.G., Zhang Y.J., Muhammad A, Zhong Y.P., Fang J.B. (2021). Transcriptomewide identification and expression analysis of ERF family genes in *Actinidia valvata* during waterlogging stress. *Scientia Horticulturae* 281:109994. <u>https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109994</u>
- Bai, D., Gu, S., Qi, X., Sun, L., Lin, M., Wang, R., Hu, C., Li, Y., Zhong, Y., Fang, J. (2023). The ERF-VII transcription factor AvERF75 positively regulates waterlogging tolerance by

interacting with AvLOB41 in kiwifruit (*Actinidia valvata*). *Environmental and Experimental Botany*, 212, 105401.

- Bai, D., Li, Z., Hu, C., Zhang, Y., Muhammad, A., Zhong, Y., & Fang, J. (2021). Transcriptomewide identification and expression analysis of ERF family genes in *Actinidia valvata* during waterlogging stress. *Scientia Horticulturae*, 281, 109994. <u>https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109994</u>
- Bailey-Serres J., Lee S.C., Brinton E. (2012). Waterproofing Crops: Effective Flooding SurvivalStrategies.PlantPhysiology160:1698-1709.www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.208173
- Balaguera-López, H. E., Salamanca-Gutiérrez, F. A., García, J. C., & Herrera-Árevalo, A. (2014).
 Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(2), 302–313.
 https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i2.3222
- Banks J.M. (2018). Chlorophyll fluorescence as a tool to identify drought stress in Acer genotypes.EnvironmentalandExperimentalBotany155:118–127.https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.022
- Bautista-Bautista, Y. (2020). Caracterización de la respuesta fisiológica por estrés abiótico y la participación de los Factores de Transcripción de la familia HSP en *Carica papaya* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México.
- Bautista-Bautista, Y., Arroyo-Álvarez, E., Fuentes, G., Girón-Ramírez, A., Chan-León, A., Estrella-Maldonado, H., Xoconostle, B., Santamaría, J. M. (2024). Genome-wide analysis of HSF genes and their role in the response to drought stress in wild and commercial *Carica papaya* L. genotypes. *Scientia Horticulturae*, 328, 112889. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.112889
- Bautista-Zuñiga F. & Aguilar-Duarte Y. (2021) Flood risk due to extreme rains in the karst of the city of Merida, Yucatan, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24: 35. <u>http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3661</u>

- Ben-Noah, I. & Friedman, S.P. (2018). Review and evaluation of root respiration and of natural and agricultural processes of soil aeration. *Vadose Zone Journal*, 17, 170119. <u>https://doi.org/10.2136/vzj2017.06.011</u>
- Bhanot L., Kumar A., Shende D., Wasewar K. (2023). Extraction of the food additive tartaric acid using octanol, methyl isobutyl ketone, kerosene, mustard oil, and groundnut oil. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry* 51: 15-20. http://www.doi.org/10.33927/hjic-2023-13
- Bonasia, R., Lucatello, S. (2019). Vinculación del mapeo de susceptibilidad a inundaciones y la gobernanza en México para la mitigación de inundaciones: Un modelo participativo. *Atmosphere*, 10(8), 424. <u>https://doi.org/10.3390/atmos10080424</u>
- Boonkerd S. & Wantha L. (2024). Antisolvent Crystallization of Papain. *Chemical Engineering Journal* 8. <u>https://doi.org/10.3390/chemengineering8010004</u>
- Bui, L. T., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., & Licausi, F. (2015). Constitutively expressed
 ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in
 Arabidopsis thaliana. *Plant Science*, 236, 37-43.
 https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.008
- Bund L.R., Gensini V.A., Van Den Broeke M.S. (2023). Tropical cyclone impacts on crop condition ratings and yield in the Coastal Southern United States. *Agricultural and Forest Meteorology* 340: 109599. <u>https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2023.109599</u>
- Bushal N., Adhikari A., Lee M., Han A., Han A.R., Kim H.S. (2022). Evaluation of growth responses of six gymnosperm species under long-term excessive irrigation and traits determining species resistance to waterlogging. *Agricultural and Forest Meteorology* 323: 109071 <u>https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109071</u>
- Bushal, N., Kim, H.S., Han, S.G., & Yoon, T.M. (2020). Photosynthetic traits and plant–water relations of two apple cultivars grown as bi-leader trees under long-term waterlogging conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104111. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104111</u>
- Cevallos-Vilatuña T, Santamaría JM (2023) Caracterización fisiológica de la respuesta a estrés por alta temperatura en *Carica papaya* cv. Maradol y Silvestre. In: Biotecnología

productiva y sostenible. Antonia Gutierrez Mora (Ed). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Jalisco, México. ISBN: 978-607-8734-57-3. 335-350. 19 Diciembre, 2023. 406 p.

- Chan-León, A., Estrella-Maldonado, H., Fuentes, G., Torres, L., Sánchez, S., & Santamaría, J. (2023). Ethylene-driven expression of genes involved in carotenoid biosynthesis during postharvest ripening is different in creole and commercial *Carica papaya* L. fruits. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 65. <u>https://doi.org/10.1007/s13580-023-00568-1</u>
- Chavez-Pesqueira, M., and J. Nuñez-Farfán. 2017. Domestication and Genetics of Papaya: A Review. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5:155. <u>https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00155</u>
- Chen M., Liu R., Huan X., Du Z., Heng S., Zeng W. (2020). Characterization of low temperatureinduced plasma membrane lipidome remodeling combined with gene expression analysis reveals mechanisms that regulate membrane lipid desaturation in *Carica papaya*. *Scientia Horticulturae* 272: 109505. <u>https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109505</u>
- Chen, H., Bullock, D. A., Jr., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2022). To Fight or to Grow: The Balancing Role of Ethylene in Plant Abiotic Stress Responses. *Plants*, 11(1), 33. <u>https://doi.org/10.3390/plants11010033</u>
- Chen, S., Tusscher, K.H.W.J., Sasidharan, R., Dekker, S.C., de Boer H.J. (2023). Parallels between drought and flooding: An integrated framework for plant eco-physiological responses to water stress. *Plant-Environment Interactions* 4(4): 175-187. https://doi.org/10.1002/pei3.10117
- Chen, Y., Leng, Y.N., Zhu, F.Y., Li, S.E., Song, T., & Zhang, J. (2023). Water-saving techniques: physiological responses and regulatory mechanisms of crops. *Advances in Biotechnology*, 1. <u>https://doi.org/10.1007/s44307-023-00003-7</u>
- Cho, H.Y., Chou, M.-Y., Ho, H.-Y., Chen, W.-C., & Shih, M.-C. (2022). Ethylene modulates translation dynamics in *Arabidopsis* under submergence via GCN2 and EIN2. *Science Advances, 8*, eabm7863. <u>https://doi.org/10.1126/sciadv.abm7863</u>

- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal, 90*(5), 856-867. https://doi.org/10.1111/tpj.13299
- Climate Central, (2022). Risk Zone Map. <u>https://ss2.climatecentral.org/#12/40.7298/-74.0070?show=satellite&projections=0-K14_RCP85-SLR&level=5&unit=feet&pois=hide</u>. [Acceso 25 de Agosto 2022].
- Conagua (2023). Estadísticas agrícolas de los Distritos de Temporal Tecnificado Año agrícola 2022-2023
- Cristóbal-Muñoz, I., Prado-Hernández, J. V., Martínez-Ruiz, A., Pascual-Ramírez, F., Cristóbal-Acevedo, D., & Cristóbal-Muñoz, D. (2022). An Improved Empirical Model for Estimating the Geometry of the Soil Wetting Front with Surface Drip Irrigation. *Water*, 14(11), 1827. <u>https://doi.org/10.3390/w14111827</u>
- De la Torre-González, A., Navarro-León, E., Blasco, B., & Ruiz, J. M. (2019). Nitrogen and photorespiration pathways, salt stress genotypic tolerance effects in tomato plants (Solanum lycopersicum L.). Acta Physiologiae Plantarum, 42(1). https://doi.org/10.1007/s11738-019-2985-8
- 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. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/eru004</u>
- Dhekney, S.A., Kandel, R., Bergey, D.R., Sitther, V., Soorianathasundaram, K., Litz R.E. (2016). Advances in papaya biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5: 133-142. <u>https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.004</u>
- Díaz-García, J. M., López-Barrera, F., Pineda, E., Toledo-Aceves, T., Andresen, E. (2020). Comparing the success of active and passive restoration in a tropical cloud forest landscape: A multi-taxa fauna approach. *PLoS ONE*, 15(11), e0242020. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242020</u>

- Eckert, I., Brown, A., Caron, D., Riva, F., Pollock, L. J. (2023). 30×30 biodiversity gains rely on national coordination. *Nature Communications*, 14, 7113.
- Espinosa-Trujillo, E., Gámez-Vázquez, A., Perches, M., Palemón Alberto, F., Hernández-Ruíz, J. (2018). Distribución geográfica potencial de papaya silvestre cultivada en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9, 1377–1388.
- Estrella-Maldonado H., Ramírez A.G., Ortiz G.F., Peraza-Echeverría S., Martínez-de la Vega O., Góngora-Castillo E., Santamaría J.M. (2021). Transcriptomic analysis reveals key transcription factors associated with drought tolerance in a wild papaya (*Carica papaya*) genotype. *PLoS One* 16: e0245855. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245855</u>
- Estrella-Maldonado, H. J. (2017). Caracterización molecular de genes que modulan la transcripción y el transporte de auxinas y su papel en la rizogénesis en vitroplantas de *Carica papaya* L. cv. Maradol. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Fabi, J. P., & Bernardino-do Padro, S. B. (2019). Fast and Furious: Ethylene-Triggered Changes in the Metabolism of Papaya Fruit During Ripening. *Frontiers in Plant Science*, 10, 535. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00535</u>
- Fabi, J. P., Seymour, G. B., Graham, N. S., Broadley, M. R., May, S. T., Lajolo, F. M., et al. (2012).
 Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an Arabidopsis-based microarray. *BMC Plant Biology*, *12*, 242. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-242</u>
- Fagerstedt, K., Pucciariello, C., Pedersen, O., Perata, P. (2023). Recent progress in understanding the cellular and genetic basis of plant responses to low oxygen hold promise for developing flood-resilient crops. *Journal of Experimental Botany*, 75. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/erad457</u>
- Fan, W., Hai, M., Guo, Y., Ding, Z., Tie, W., Ding, X., Yan, Y., Wei, Y., Liu, Y., Wu, C., Shi, H., Li,
 K., & Hu, W. (2016). ERF transcription factor family in cassava: genome-wide characterization and expression analyses against drought stress. *Scientific Reports, 6*, 37379. <u>https://doi.org/10.1038/srep37379</u>.

FAO (2024) Major Tropical Fruits Market Review. Preliminary Results 2023. Rome.

- Fatma, M., Asgher, M., Iqbal, N., Rasheed, F., Sehar, Z., Sofo, A., & Khan, N. A. (2022). Ethylene signaling under stressful environments: Analyzing collaborative knowledge. *Plants* (*Basel*), 11(17), 2211. <u>https://doi.org/10.3390/plants11172211</u>
- Flores-Hernández, L. A., Otero-Sánchez, M. A., Marín-Montes, I. M., Sabino-López, J. E., Vélez-Torres, M. (2024). Recursos genéticos de papaya en México y su conservación para el mejoramiento genético. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 15(8), e3678.
- Fuentes G. & Santamaria J. (2014). Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication and Production. In Ming Ray and Moore Paul (eds.), Plant Genetics and Genomics of Papaya. Crops and Models. 10th ed., Springer pp. 3-15.
- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and waterlogging stress in plants: a review highlighting research opportunities and understudied aspects. *Frontiers in Plant Science*, 10, 340. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00340
- Gamboa-Tuz, S. D., Pereira-Santana, A., Zamora-Briseño, J. A., Castaño, E., Espadas-Gil, F., Ayala-Sumuano, J. T., Keb-Llanes, M. A., Sánchez-Teller, F., Rodríguez-Zapata, L. C. (2018). Transcriptomics and co-expression networks reveal tissue-specific responses and regulatory hubs under mild and severe drought in papaya (*Carica papaya* L.). *Scientific Reports*, 8, 14539. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-018-32904-2</u>
- Gasch, P., Fundinger, M., Müller, J. T., Lee, T., Bailey-Serres, J., & Mustroph, A. (2016). Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28(1), 160-180. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00866
- Geng, S., Lin, Z., Xie, S., Xiao, J., Wang, H., Zhao, X., Zhou, Y., & Duan, L. (2023). Ethylene enhanced waterlogging tolerance by changing root architecture and inducing aerenchyma formation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 287, 154042. <u>https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154042</u>
- Gibbs, D. J., Conde, J.-V., Berckhan, S., Prasad, G., Mendiondo, G. M., Holdsworth, M. J. (2015). Group VII ethylene response factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction

and stress responses in plants. *Plant Physiology, 169*(1), 23–31. https://doi.org/10.1104/pp.15.00338

- Gibbs, D. J., Theodoulou, F. L., & Bailey-Serres, J. (2025). Primed to persevere: Hypoxia regulation from epigenome to protein accumulation in plants. *Plant Physiology*, 197(1), kiae584. <u>https://doi.org/10.1093/plphys/kiae584</u>
- Gil, A.I., Miranda, D. (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (Carica papaya L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. *Agronomía Colombiana*, *23*(2), 217–222.
- 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 wild and commercial papaya genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 183, 104341. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104341</u>
- Githui, F., Beverly, C., Aiad, M., McCaskill, M., Liu, K., & Harrison, M. T. (2022). Modelling waterlogging impacts on crop growth: a review of aeration stress definition in crop models and sensitivity analysis of APSIM. *International Journal of Plant Biology*, 13(3), 180–200. <u>https://doi.org/10.3390/iipb13030017</u>
- Giuntoli, B., Lee, S. C., Licausi, F., Kosmacz, M., Oosumi, T., van Dongen, J. T., Bailey-Serres, J., & Perata, P. (2014). A trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in *Arabidopsis. PLoS Biology*, 12, e1001950. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001950
- Giuntoli, B., Perata, P. (2018). Group VII Ethylene Response Factors in *Arabidopsis*: Regulation and physiological roles. *Plant Physiology*, 176(2), 1143–1155. <u>https://doi.org/10.1104/pp.17.01225</u>
- González-Moreno, S., Perales-Vela, H., & Salcedo-Alvarez, M.O. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.

- González-Oviedo, N. A., Fuentes, G., Santamaría, J. M. (2025). Fisiología del estrés por anegamiento prolongado en plántulas de papaya silvestre (*Carica papaya* L.) colectadas en Yucatán, México. *Tropical and Subtropical agroecosystems*, 28, 25.
- González-Oviedo, N. A., Fuentes-Ortíz, G., Santamaría, J. M. (2025). Wild *Carica papaya* genotype is more waterlogging resilient than its commercial counterpart. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 37, 13. <u>https://doi.org/10.1007/s40626-024-00361-0</u>
- Granados-Ramírez, R., Salceda-López, R., Longar-Blanco, M. D. (2015). Situación actual y perspectivas tecnológicas para la papaya (*Carica papaya* L.) en el distrito de Veracruz, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 6(4)*, 749-761.
- Gu, L. (2023). Optimizing the electron transport chain to sustainably improve photosynthesis. *Plant Physiology*, 193, 2398-2412. <u>https://doi.org/10.1093/plphys/kiad490</u>
- Guo, M., Yao, Y., Yin, K., Tan, L., Liu, M., Hou, J., Zhang, H., Liang, R., Zhang, X., Yang, H., et al. (2024). ACBP4-WRKY70-RAP2.12 module positively regulates submergence-induced hypoxia response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 66, 1052– 1067.
- Guo, Z., Lv, J., Zhang, H., Hu, C., Qin, Y., Dong, H., Zhang, T., Dong, X., Du, N., Piao, F. (2022).
 Red and blue light function antagonistically to regulate cadmium tolerance by modulating the photosynthesis, antioxidant defense system and Cd uptake in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128412.
 https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128412
- Habibi, F., Liu, T., Adnan-Shahid, M., Schaffer, B., Sarkosh, A. (2023). Physiological, biochemical, and molecular responses of fruit trees to root zone hypoxia. *Environmental and Experimental Botany*, 206, 105179. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105179</u>
- Han D., Han J., Yang G., Wang S., Xu T., Li, W. (2020). An ERF transcription factor gene from Malus baccata (L.) Borkh, MbERF11, affects cold and salt stress tolerance in Arabidopsis. Forests, 11(5), 514. <u>https://doi.org/10.3390/f11050514</u>.
- Hartman, S., Liu, Z., van Veen, H., Vicente, J., Reinen, E., Martopawiro, S., Zhang, H., van Dongen, N., Bosman, F., Bassel, G. W., Visser, E. J. W., Bailey-Serres, J., Theodoulou,

F. L., Hebelstrup, K. H., Gibbs, D. J., Holdsworth, M. J., Sasidharan, R., & Voesenek, L. A. C. J. (2019). Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress. *Nature Communications, 10*, 4020. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-019-12045-4</u>

- Hartman, S., van Dongen, N., Renneberg, D. M. H. J., Welschen-Evertman, R. A. M., Kociemba, J., Sasidharan, R., & Voesenek, L. A. C. J. (2020). Ethylene differentially modulates hypoxia responses and tolerance across *Solanum* species. *Plants*, 9(8), 1022. https://doi.org/10.3390/plants9081022
- Hess, N., Klode, M., Anders, M., Sauter, M. (2011). The hypoxia responsive transcription factor genes ERF71/HRE2 and ERF73/HRE1 of Arabidopsis are differentially regulated by ethylene. *Physiologia Plantarum*, 143(1), 41-49. <u>https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01486.x</u>
- Houben, M., & Van de Poel, B. (2019). 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO): The Enzyme That Makes the Plant Hormone Ethylene. *Frontiers in Plant Science*, 10, 695. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695</u>
- Hrvoje, L., Ivan, B., Vera, C., Vlatka, J., Jasenka, A., Jambrovic, A., Josip, B., & Domagoj, S. (2012). Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum*, 114(1), 73-76.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 800. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800</u>
- Huang, X., Wang, K., Wen, X., Liu, J., Zhang, Y., Rong, J., Nie, M., Fu, C., Zheng, B., Yuan, Z., Gong, L., Zhan, H., Shen, R. (2023). Flooding duration affects the temperature sensitivity of soil extracellular enzyme activities in a lakeshore wetland in Poyang Lake, China. *Science of The Total Environment*, 874, 162397. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162397
- Huo L., Wang H., Wang Q., Gao Y., Xu K., Sun X. (2022). Exogenous treatment with melatonin enhances waterlogging tolerance of kiwifruit plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1081787. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1081787</u>

- Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., and Khan, M.I.R. 2017. Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. *Frontiers in Plant Sciences* 8:475. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475</u>
- Jaimes-Miranda, F., & Chávez Montes, R. A. (2020). The plant MBF1 protein family: a bridge between stress and transcription. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1782-1791. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/erz525</u>
- Jiménez, V.M., Mora-Newcomer, E., Gutiérrez-Soto, M.V. (2014). Advances in papaya tissue culture and transformation. En: Ming, R., Moore, P.H. (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya*. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, vol. 10. Springer, New York, NY, pp. 17-33.
- Jovic D., Liang X., Zeng H., Lin L., Xu F., Luo Y. (2022). Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clinical and Translational Medicine*, 12(3). https://doi.org/10.1002/ctm2.694
- Juntawong P., Sirikhachornkit A., Pimjan R., Sonthirod C., Sangsrakru D., Yoocha T., Tangphatsornruang S., Srinives P. (2014). Elucidation of the molecular responses to waterlogging in Jatropha roots by transcriptome profiling. *Frontiers in Plant Sciences* 5: 658. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00658
- Juntawong, P., Butsayawarapat, P., Songserm, P., Pimjan, R., & Vuttipongchaikij, S. (2020).
 Overexpression of *Jatropha curcas* ERFVII2 transcription factor confers low oxygen tolerance in transgenic *Arabidopsis* by modulating expression of metabolic enzymes and multiple stress-responsive genes. *Plants, 9*(9), 1–17.
 <u>https://doi.org/10.3390/plants9091068</u>
- Khan, M.I.R., Trivellini, A., Chhillar, H., Chopra, P., Ferrante, A., Khan, N.A., and Ismail, A.M.
 2020. The significance and functions of ethylene in flooding stress tolerance in plants. *Environmental* and *Experimental* Botany 179: 104188.
 https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104188
- Khayrul, K.B., Tareq, Md.Z., Amin, Md.R., Honi, U., Arif, Md.T.U., Sadat, Md.A., Hossen, Md.M. 2019. Phytohormone-Mediated Stomatal Response, Escape and Quiescence Strategies

CAPÍTULO VI in Plants under Flooding Stress. Agronomy 9(2): 43. https://doi.org/10.3390/agronomy9020043

- Kim H. S., Ji C. Y., Lee C.-J., Kim S.-E., Park S.-C., Kwak S.-S. (2018). Orange: a target gene for regulating carotenoid homeostasis and increasing plant tolerance to environmental stress in marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3393–3400. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/ery023</u>
- Kim N. Y., Jang Y. J., Park O. K. (2018). AP2/ERF Family Transcription Factors ORA59 and RAP2.3 Interact in the Nucleus and Function Together in Ethylene Responses. *Frontiers in Plant Science*, 9. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01675</u>
- Kiruba, G., Pushpa, R., Arulmozhi, R., Dhandapani, M., Rajendran, R.A., & Ramlal, A. (2025). Breeding Climate-Resilient Soybean in the Climate Change Era: Current Breeding Strategies and Prospects. In M.K. Pandey, M.G. Mallikarjuna, H.C. Lohithaswa, S. Aski, & M. Gupta (Eds.), Breeding Climate Resilient and Future Ready Oilseed Crops. Springer, Singapore. <u>https://doi.org/10.1007/978-981-97-7744-0_12</u>
- Knipfer T., Bambach N., Hernandez M.I., Bartlett M.K., Sinclair G., Duong F., Kluepfel D.A., McElrone A.J. (2020). Predicting stomatal closure and turgor loss in woody plants using predawn and midday water potential. *Plant Physiology* 184: 881–894. https://doi.org/10.1104/pp.20.00500
- Kong L., Song Q., Wei H., Wang Y., Lin M., Sun K., Zhang Y., Yang J., Li C., Luo K. (2023). The AP2/ERF transcription factor *PtoERF15* confers drought tolerance via JA-mediated signaling in *Populus*. *New Phytologist*, 240, 1848-1867. <u>https://doi.org/10.1111/nph.19251</u>.
- Koul, B., Pudhuvai, B., Sharma, C., Kumar, A., Sharma, V., Yadav, D., Jin, J.O. (2022). *Carica papaya* L.: A Tropical Fruit with Benefits beyond the Tropics. *Diversity*, 14(8), 683.
- Küpper H., Benedikty Z., Morina F., Andresen E., Mishra A., Trtílek M. (2019). Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and QA reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiology*, 179, 369-381. <u>https://doi.org/10.1104/pp.18.00953</u>

- Kwok, D. C. Y., & Liang, D. D. S. S. (2019). *Biology of papaya*. http://www.biosafety.gov.my/msmy/pustaka-media/Documents/biological document-papaya.pdf
- Kyeong-Cheol L., Kweon H., Jung-Won S., Yong S.K., Yeong G.S., Sangsub C., Koo N. (2022).
 Physiological response analysis for the diagnosis of drought and waterlogging damage in *Prunus yedoensis. Forensic Science Technology*, 18, 14-25. <u>https://doi.org/10.1080/21580103.2022.2035829</u>
- Leeggangers H. A. C. F., Rodriguez-Granado, N. Y., Macias-Honti M. G., Sasidharan, R. (2023). A helping hand when drowning: The versatile role of ethylene in root flooding resilience. *Environmental and Experimental Botany*, 213, 105422. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105422</u>
- León, J., Castillo, M. C., Gayubas, B. (2021). The hypoxia–reoxygenation stress in plants. *Journal* of Experimental Botany, 72(16), 5841–5856. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/eraa591</u>
- León, J., Costa-Broseta, Á. Castillo, M. C. (2020). RAP2.3 negatively regulates nitric oxide biosynthesis and related responses through a rheostat-like mechanism in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 71(10), 3157–3171. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/eraa069</u>
- León-Burgos A.F., Unigarro C.A., Balaguera-López H.E. (2022). Soil waterlogging conditions affect growth, water status, and chlorophyll "a" fluorescence in coffee plants (*Coffea arabica* L.). *Agronomy*, 12, 1270. <u>https://doi.org/10.3390/agronomy12061270</u>
- Li C., Su, J., Zhao, N., Lou, L., Ou, X., Yan, Y., Wang, L., Jiang, J., Chen, S., & Chen, F. (2023). CmERF5-CmRAP2.3 transcriptional cascade positively regulates waterlogging tolerance in *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Biotechnology Journal*, 21, 270-282. https://doi.org/10.1111/pbi.13940
- Li, B., Wang, X., Wang, X., & Xi, Z. (2023). An AP2/ERF transcription factor VvERF63 positively regulates cold tolerance in Arabidopsis and grape leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 205, 105124. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105124</u>.
- Licausi F., Ohme-Takagi M., Perata P. (2013). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist, 199*(3), 639-649. <u>https://doi.org/10.1111/nph.12291</u>
- Licausi F., van Dongen J. T., Giuntoli B., Novi G., Santaniello A., Geigenberger P., Perata P. (2010). HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *6*2(2), 302-315. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04149.x
- Lin C., Peralta Ogorek LL, Pedersen O, Sauter M (2021) Oxygen in the air and oxygen dissolved in the floodwater both sustain growth of aquatic adventitious roots in rice. J Exp Bot 72: 1879–1890. <u>https://doi.org/10.1093/jxb/eraa542</u>
- Lin S.Y., Chen P.A., Zhuang B.W. (2022). The stomatal conductance and Fv/Fm as the indicators of stress tolerance of avocado seedlings under short-term waterlogging. *Agronomy* 12: 1084. <u>https://doi.org/10.3390/agronomy12051084</u>
- Lin T.Y., Wu Y.T., Chang H.J., Huang C.C., Cheng K.C., Hsu H.Y., Hsieh C.W. (2023). Anti-Inflammatory and anti-Oxidative effects of polysaccharides extracted from unripe *Carica papaya* L. Fruit. *Antioxidants* 12: 1506. <u>https://doi.org/10.3390/antiox12081506</u>
- Lin Y.x., Xu H.J., Yin G.K., Zhou Y.C., Lu X.X., Xin X. (2022). Dynamic changes in membrane lipid metabolism and antioxidant defense during soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed aging. *Frontiers in Plant Science* 13. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2022.90894</u>
- Lin, H.H., Lin, K.H., Huang, M.Y., & Su, Y.R. (2020). Use of non-destructive measurements to identify cucurbit species (*Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*) tolerant to waterlogged conditions. *Plants (Basel)*, 9, 1226. <u>https://doi.org/10.3390/plants9091226</u>
- Liu, Z., Hartman, S., van Veen, H., Zhang, H., Leeggangers, H. A. C. F., Martopawiro, S., Bosman, F., de Deugd, F., Su, P., Hummel, M., Rankenberg, T., Hassall, K. L., Bailey-Serres, J., Theodoulou, F. L., Voesenek, L. A. C. J., & Sasidharan, R. (2022). Ethylene augments root hypoxia tolerance via growth cessation and reactive oxygen species amelioration. *Plant Physiology*, 190(2), 1365-1383. <u>https://doi.org/10.1093/plphys/kiac245</u>
- Loreti E. y Perata P. (2020). The many facets of hypoxia in plants. *Plants* (Basel) 9: 745. https://doi.org/10.3390/plants9060745
- Loreti, E.y Perata, P. (2023). ERFVII transcription factors and their role in the adaptation to hypoxia in *Arabidopsis* and crops. *Frontiers in Genetics*, 14, 1213839.

- Loreti, E., Valeri, M. C., Novi, G., y Perata, P. (2017). Gene Regulation and Survival under Hypoxia Requires Starch Availability and Metabolism. Plant Physiology, 176(2), 1286-1298. <u>https://doi.org/10.1104/pp.17.01002</u>
- Lothier J., Diab H., Cukier C., Limami A.M., Tcherkez G. (2020). Metabolic responses to waterlogging differ between roots and shoots and reflect phloem transport alteration in *Medicago truncatula*. *Plants* 9: 1373. <u>https://doi.org/10.3390/plants9101373</u>
- Lou, S., Guo, X., Liu, L., Song, Y., Zhang, L., Jiang, Y., Zhang, L., Sun, P., Liu, B., Tong, S., Chen, N., Liu, M., Zhang, H., Liang, R., Feng, X., Zheng, Y., Liu, H., Holdsworth, M. J., & Liu, J. (2022). Allelic shift in cis-elements of the transcription factor RAP2.12 underlies adaptation associated with humidity in *Arabidopsis thaliana*. *Science Advances*, 8(18). https://doi.org/10.1126/sciadv.abn8281
- Luan, H., Guo, B., Shen, H., Pan, Y., Hong, Y., Lv, C., & Xu, R. (2020). Overexpression of Barley Transcription Factor *HvERF2.11* in Arabidopsis Enhances Plant Waterlogging Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(6), 1982. <u>https://doi.org/10.3390/ijms21061982</u>
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J.J.M., Pinzón-López, L.L. (2012). Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 343-353.
- Luo, H., Liu, S., Song, Y., Qin, T., Xiao, S., Li, W., Xu, L., & Zhou, X. (2024). Effects of Waterlogging Stress on Root Growth and Soil Nutrient Loss of Winter Wheat at Seedling Stage. Agronomy, 14(6), 1247. <u>https://doi.org/10.3390/agronomy14061247</u>
- Manghwar, H., Hussain, A., Alam, I., Khoso, M.A., Ali, Q., Liu, F. (2024). Waterlogging stress in plants: Unraveling the mechanisms and impacts on growth, development, and productivity. *Environmental and Experimental Botany*, 224, 105824. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.105824</u>
- Mardero, S., Schmook, B., López-Martínez, J.O., Cicero, L., Radel, C., and Christman, Z. 2018. The Uneven Influence of Climate Trends and Agricultural Policies on Maize Production in the Yucatan Peninsula, Mexico. Land 7:80 <u>https://doi.org/10.3390/land7030080</u>

- Maric, A., & Hartman, S. (2022). Ethylene controls translational gatekeeping to overcome flooding stress in plants. *The EMBO Journal, 41*, e112282. https://doi.org/10.15252/embj.2022112282
- Mejía-Calderón, G., Vides, J. E. (2018) Cultivo de la papaya (Carica papaya L.). El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova".
- Morales-Olmedo, M., Ortiz, M., Sellés, G. (2015). Effects of transient soil waterlogging and its importance for rootstock selection. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75(Supl. 1), 45-56. <u>https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392015000300006</u>
- Moreno-Roblero, M. de J., Pineda-Pineda, J., Colinas-León, M. T., & Sahagún-Castellanos, J. (2020). El oxígeno en la zona radical y su efecto en las plantas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 11(4)*, 931–943. <u>https://doi.org/10.29312/remexca.v11i4.2128</u>
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169, 32–41. <u>https://doi.org/10.1104/pp.15.00677</u>
- Nazarian, R. H., Brizuela, N. G., Matijevic, B. J., Vizzard, J. V., Agostino, C. P., & Lutsko, N. J. (20 Bonasia, R., Lucatello, S. (2019). Vinculación del mapeo de susceptibilidad a inundaciones y la gobernanza en México para la mitigación de inundaciones: Un modelo participativo. *Atmosphere*, 10(8), 424. <u>https://doi.org/10.3390/atmos10080424</u>
- Nie, S., & Wang, D. (2023). AP2/ERF transcription factors for tolerance to both biotic and abiotic stress factors in plants. *Tropical Plant Biology*, 16, 1-8. <u>https://doi.org/10.1007/s12042-023-09339-9</u>.
- Niones, J. M., Suralta, R. R., Inukai, Y., & Yamauchi, A. (2013). Roles of Root Aerenchyma Development and Its Associated QTL in Dry Matter Production under Transient Moisture Stress in Rice. *Plant Production Science*, 16(3), 205-216. <u>https://doi.org/10.1626/pps.16.205</u>
- Okereke CN, Kaurilind E, Liu B, Kanagendran A, Pazouki L, Niinemets Ü (2022) Impact of heat stress of varying severity on papaya (*Carica papaya*) leaves: Major changes in stress

CAPÍTULO VI

volatile signatures, but surprisingly small enhancements of total emissions. *Environmental and Experimental Botany* 195: 104777. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104777</u>

- Oliva-Díaz, H.M., Noriega-Carreras, C.M., Betancourt-Grandal, M., García-Álvarez, M.E. (2023).
 Fisiología y su relación con el clima. En: García Álvarez, M.E. (Ed.), *Cultivo y comercialización de la papaya*. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba, pp. 49-70
- Olorunwa O.J., Adhikari B., Brazel S., Popescu S.C., Popescu G.V., Barickman T.C. (2022). Short waterlogging events differently affect morphology and photosynthesis of two cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Frontiers in Plant Science* 13: 896244. https://doi.or/10.3389/fpls.2022.896244
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., & Hirt, H. (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 22(6), 1282-1288. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/cdg131</u>
- Ouyang Z, Tian J, Yan X, Shen H (2020) Effects of different concentrations of dissolved oxygen or temperatures on the growth, photosynthesis, yield, and quality of lettuce. *Agricultural Water Management* 228: 105896. <u>https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.105896</u>
- Pan, D.-L., Wang, G., Wang, T., Jia, Z.-H., Guo, Z.-R., & Zhang, J.-Y. (2019). AdRAP2.3, a novel ethylene response factor VII from *Actinidia deliciosa*, enhances waterlogging resistance in transgenic tobacco through improving expression levels of PDC and ADH genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1189. <u>https://doi.org/10.3390/ijms20051189</u>
- Papdi, C., Pérez-Salamó, I., Joseph, M. P., Giuntoli, B., Bögre, L., Koncz, C., & Szabados, L. (2015). The low oxygen, oxidative, and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes RAP2.12, RAP2.2, and RAP2.3. *Plant Journal*, 82(5), 772-784. <u>https://doi.org/10.1111/tpj.12848</u>
- Pattyn, J., Vaughan-Hirsch, J., & Van de Poel, B. (2021). The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry. *New Phytologist, 229*(2), 770-782. <u>https://doi.org/10.1111/nph.16873</u>

- Paul, A., Sng, N. J., Zupanska, A. K., Krishnamurthy, A., Schultz, E. R., & Ferl, R. J. (2017). Genetic dissection of the Arabidopsis spaceflight transcriptome: Are some responses dispensable for the physiological adaptation of plants to spaceflight? *PLoS ONE*, 12(6), e0180186. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180186</u>
- Paul, M. V., Iyer, S., Amerhauser, C., Lehmann, M., van Dongen, J. T., & Geigenberger, P. (2016).
 Oxygen sensing via the ethylene response transcription factor RAP2.12 affects plant metabolism and performance under both normoxia and hypoxia. *Plant Physiology*, 172(1), 141-153. <u>https://doi.org/10.1104/pp.16.00460</u>
- Peña-Castro, J. (2014). Respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: Lecciones aprendidas del gen SUB1A. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37, 325-337. https://doi.org/10.35196/rfm.2014.4.325
- Por Esto! (2024). Papayeros de Holpechén no logran recuperarse de las pérdidas que dejaron las lluvias de julio. <u>https://www.poresto.net/campeche/2024/9/9/papayeros-de-hopelchen-no-logran-recuperarse-de-las-perdidas-que-dejaron-las-lluvias-de-julio-.html</u> [Acceso 29 de septiembre 2024].
- Puciarello C. & Perata P. (2021). The oxidative paradox in low oxygen stress in plants. *Antioxidants* 10(2): 332. <u>https://doi.org/10.3390/antiox10020332</u>
- Refahi A. & Shahsavar A.R. (2017). Effects of salinity stress on certain morphological traits and antioxidant enzymes of two *Carica papaya* cultivars in hydroponic culture. *Advances in Horticultural Science* 31: 131–140. <u>https://doi.org/10.13128/ahs-21090</u>
- Renzi J.P., Coyne C.J., Berger J., von Wettberg E., Nelson M., Ureta S., Hernández F., Smýkal
 P., Brus J. (2022). How Could the Use of Crop Wild Relatives in Breeding Increase the
 Adaptation of Crops to Marginal Environments? *Frontiers in Plant Science*, 13, 886162.
 https://doi.org/10.3389/fpls.2022.886162
- Rico-Cambron T., Bello-Bello E., Herrera-Estrella L. (2023). A non-invasive method to predict drought survival in Arabidopsis using quantum yield under light conditions. *Plant Methods* 19: 127. <u>https://doi.org/10.1186/s13007-023-01107-w</u>

- Riedesel, L., Ma, D., Piepho, H., Laidig, F., Möller, M., Golla, B., Kautz, T., & Feike, T. (2024).
 Climate change induced heat and drought stress hamper climate change mitigation in
 German cereal production. *Field Crops Research*, 317, 109551.
 https://doi.org/10.1016/j.fcr.2024.109551
- Rodríguez G., Schaffer B., Basso C., Vargas A. (2014). Efecto del tiempo de inundación del sistema radical sobre algunos aspectos fisiológicos y desarrollo del cultivo de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía* 40: 89-98.
- Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., González-Mas, M. C., Primo-Millo, E., Iglesias, D. J., & Forner-Giner, M. A. (2011). Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry, 49*(6), 636-645. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.003
- Rollando R., Maulada F., Afthoni M.H, Monica E., Yuniati Y., Nugraha A.T. (2023). Screening *Carica papaya* compounds as an antimalarial agent: *In silico* study. *Tropical Journal of Natural Product Research* 7: 2895–2903 <u>http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i5.9</u>.
- Ruiz-Gil P.J., Wegier A., Alavez V., Rosas-Plaza S., Núñez-Farfán J., Chávez-Pesqueira M. (2023). Wild papaya shows evidence of gene flow from domesticated Maradol papaya in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 70: 2391–2410. https://doi.org/10.1007/s10722-023-01568-x
- Rupngam, T., & Messiga, A. J. (2024). Unraveling the Interactions between Flooding Dynamics and Agricultural Productivity in a Changing Climate. *Sustainability*, *16*(14), 6141. <u>https://doi.org/10.3390/su16146141</u>
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants, 10*(2), 277. <u>https://doi.org/10.3390/antiox10020277</u>
- SAGARPA-Secretaría-de-Agricultura-ganadería-Desarrollo-Rural-Pesca-y-Alimentación. (2017). Agrícola Nacional. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, I*(1), 1–14.
- Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic Diversity, Conservation, and Utilization of Plant Genetic Resources. *Genes*, 14(1), 174. <u>https://doi.org/10.3390/genes14010174</u>

- Santa Cruz-Suárez, A., Nápoles-García, M.C., Morales-Guevara, D. (2022). El déficit hídrico en los cultivos y la acción de los microorganismos. *Cultivos Tropicales*, 43(3), 1-8.
- Sasidharan R., Hartman S., Liu Z., Martopawiro S., Sajeev N., van Veen H., Yeung E., Voesenek L.A.C.J. (2018). Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiology* 176: 1106-1117. <u>www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.17.01232</u>
- Sathi, K., Masud, A., Falguni, M., Ahmed, N., Rahman, K., & Hasanuzzaman, M. (2022).
 Screening of soybean genotypes for waterlogging stress tolerance and understanding the physiological mechanisms. *Advances in Agriculture*, 2022, 1-14. https://doi.org/10.1155/2022/5544665
- Shah, S.H.H., Wang, J., Hao, X., Thomas, B.W. (2022). Modelling soil salinity effects on salt water uptake and crop growth using a modified denitrification-decomposition model: A phytoremediation approach. *Journal of Environmental Management*, 301, 113820. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113820
- Sharma, S., Bhatt, U., Sharma, J., Kalaji, H., Mojski, J., & Soni, V. (2022). Ultrastructure, adaptability, and alleviation mechanisms of the photosynthetic apparatus in plants under waterlogging: A review. *Photosynthetica*, 60(3), 430-444. https://doi.org/10.32615/ps.2022.033
- Sharma, S., Gupta, R.K., Rana, V.S., et al. (2024). Forecasting the future of papaya in India: predicting area and production through autoregressive integrated moving average. *Applied Fruit Science*, 66, 183–191.
- Sherin G., Aswathi K.P.R., Puthur J.T. (2022). Photosynthetic functions in plants subjected to stresses are positively influenced by priming. *Plant Stress* 4: 100079. https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100079
- Shi, W., Song, Y., Liu, T., Ma, Q., Yin, W., Shen, Y., Liu, T., Jiang, C., Zhang, K., Lv, D., Song, B., Wang, J., & Liu, X. (2021). StRAP2.3, an ERF-VII transcription factor, directly activates
 StInvInh2 to enhance cold-induced sweetening resistance in potato. *Horticulture Research*, 8, 82. <u>https://doi.org/10.1038/s41438-021-00522-1</u>

- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D. G., & Pae, H.-O. (2011). Mitogenactivated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways? *Journal of Signal Transduction, 2011*, 792639. https://doi.org/10.1155/2011/792639
- Striker, G. G. (2012). Time is on our side: the importance of considering a recovery period when assessing flooding tolerance in plants. *Ecological Research*, 27(5), 983-987. https://doi.org/10.1007/s11284-012-0978-9
- Tabari, H. (2020). Climate change impact on flood and extreme precipitation increases with water availability. *Scientific Reports*, 10(1). <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-70816-2</u>
- Tan, G., Ali, A., & Siddiqui, Y. (2023). Major fungal postharvest diseases of papaya: Current and prospective diagnosis methods. *Crop Protection*, 174, 106399. <u>https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106399</u>
- Tang H., Bi H., Liu B., Lou S., Song Y., Tong S., Chen N., Jiang Y., Liu J., Liu H. (2021). WRKY33 interacts with WRKY12 protein to up-regulate RAP2.2 during submergence-induced hypoxia response in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol 229: 106-125. https://doi.org/10.1111/nph.17020
- Taylor-Kearney, L. J., Madden, S., Wilson, J., Myers, W. K., Gunawardana, D. M., Pires, E., Holdship, P., Tumber, A., Rickaby, R. E. M., & Flashman, E. (2022). Plant cysteine oxidase oxygen-sensing function is conserved in early land plants and algae. ACS Bio & Med Chem Au, 2(5), 521-528. https://doi.org/10.1021/acsbiomedchemau.2c00032
- Taylor-Kearney, L.J. and Flashman, E. (2022), Targeting plant cysteine oxidase activity for improved submergence tolerance. *Plant J*, 109: 779-788. <u>https://doi.org/10.1111/tpj.15605</u>
- Teoh, E. Y., Teo, C. H., Baharum, N. A., & Tan, B. C. (2024). Expressing banana transcription factor *MaERFVII3* in Arabidopsis confers enhanced waterlogging tolerance and root growth. *PeerJ*, *12*, e17285. <u>https://doi.org/10.7717/peerj.17285</u>
- Thani Q.A., Schaffer B, Liu G, Vargas AI, Crane JH (2016) Chemical oxygen fertilization reduces stress and increases recovery and survival of flooded papaya (*Carica papaya* L.) plants. *Scientia Horticulturae* 202: 173-183. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.004</u>

- Tian L, Zhang Y, Chen P, Zhang F, Li J, Yan F, Dong Y, Feng B (2021) How Does the Waterlogging Regime Affect Crop Yield? A Global Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science* 12: 634898. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634898</u>
- Timilsina, A., Dong, W., Hasanuzzaman, M., Liu, B., & Hu, C. (2022). Nitrate–Nitrite–Nitric Oxide Pathway: A Mechanism of Hypoxia and Anoxia Tolerance in Plants. *International Journal* of Molecular Sciences, 23(19), 11522. <u>https://doi.org/10.3390/ijms231911522</u>
- Tirnaz S, Zandberg J, Thomas WJW, Marsh J, Edwards D, Batley J (2022) Application of crop wild relatives in modern breeding: An overview of resources, experimental and computational methodologies. *Frontiers in Plant Science* 13: 1008904. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1008904
- Todorova D., Aleksandrov V., Anev S., Sergiev I. (2023). Comparative study of photosynthesis performance of herbicide-treated young triticale plants during drought and waterlogging stress. *Agronomy* 13: 1992. <u>https://doi.org/10.3390/agronomy13081992</u>
- Tong, C., Hill, C. B., Zhou, G., Zhang, X.-Q., Jia, Y., & Li, C. (2021). Opportunities for Improving Waterlogging Tolerance in Cereal Crops—Physiological Traits and Genetic Mechanisms. *Plants*, *10*(8), 1560. https://doi.org/10.3390/plants10081560
- Toral-Juárez, M. A., Avila, R. T., Cardoso, A. A., Brito, F. A., Machado, K. L., Almeida, W. L., Souza, R. P., Martins, S. C., & DaMatta, F. M. (2020). Drought-tolerant coffee plants display increased tolerance to waterlogging and post-waterlogging reoxygenation. *Environmental and Experimental Botany*, 182, 104311. <u>https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104311</u>
- Ugalde, J. M. (2022). Every breath you don't take, I'll be helping you: Ethylene promotes hypoxia tolerance. *Plant Physiology*, 190(2), 1085–1087. <u>https://doi.org/10.1093/plphys/kiac347</u>
- Ullah, N., Tan, D. K. Y., Ahmad, W., & Pampana, S. (2024). Editorial: Adaptation of plants to waterlogging and hypoxia. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1425012. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1425012</u>
- Unger, I.M., Kennedy, A.C., Muzika, R.-M. (2009). Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 1-8. <u>https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.01.007</u>

United Nations. (2023). Climate Change Annual Report 2022. ISBN 978-92-9219-209-9.

- 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.
- Valeri, M. C., Novi, G., Weits, D. A., Mensuali, A., Perata, P., Loreti, E. (2020). Botrytis cinerea induces local hypoxia in Arabidopsis leaves. *New Phytologist*, 229(1), 173-185. <u>https://doi.org/10.1111/nph.16513</u>
- Vallejo-Reyna, M. A., Santamaría, J. M., Rodríguez-Zapata, L. C., Herrera-Valencia, V. A., & Peraza-Echeverria, S. (2015). Identification of novel ERF transcription factor genes in papaya and analysis of their expression in different tissues and in response to the plant defense inducer benzothiadiazole (BTH). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *91*, 141-151. <u>https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.06.005</u>
- van Veen, H., Triozzi, P. M., & Loreti, E. (2025). Metabolic strategies in hypoxic plants. *Plant Physiology*, 197(1), kiae564. <u>https://doi.org/10.1093/plphys/kiae564</u>
- Wang, H., Li, C., Wang, L., Zhong, H., Xu, X., Cheng, Y., Nian, H., Liu, W., Chen, P., Zhang, A., & Ma, Q. (2023). *GmABR1* encoding an ERF transcription factor enhances the tolerance to aluminum stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *14*. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1125245.
- White, M. D., Dalle Carbonare, L., Lavilla Puerta, M., Iacopino, S., Edwards, M., Dunne, K., Pires, E., Levy, C., McDonough, M. A., Licausi, F., & Flashman, E. (2020). Structures of *Arabidopsis thaliana* oxygen-sensing plant cysteine oxidases 4 and 5 enable targeted manipulation of their activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117*(37), 23140–23147. https://doi.org/10.1073/pnas.2000206117
- Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H., & Yin, Y. (2019). AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1– 17. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00228</u>

- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., & Ren, D. (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26996-27006. https://doi.org/10.1074/jbc.M801392200
- Xu, L., Yang, L., Li, A., Guo, J., Wang, H., Qi, H., Li, M., Yang, P., & Song, S. (2024). An AP2/ERF transcription factor confers chilling tolerance in rice. *Science Advances, 10*, eado4788. <u>https://doi.org/10.1126/sciadv.ado4788</u>.
- Yan, Z., Yang, S., Lin, C., Yan, J., Liu, M., Tang, S., Jia, W., Liu, J., & Liu, H. (2024). Advances in plant oxygen sensing: Endogenous and exogenous mechanisms. *Journal of Genetics* and Genomics. <u>https://doi.org/10.1016/j.jgg.2024.11.014</u>
- Yin, D., Chen, S., Chen, F., Guan, Z., Fang, W., & Jiang, J. (2019). PhERF2 contributes to waterlogging tolerance by promoting ethylene biosynthesis in petunia. Horticulture Research, 6, 42. https://doi.org/10.1038/s41438-019-0126-2
- Yordanova, R.Y., Uzunova, A.N., and Popova, L.P. 2005. Effects of short-term soil flooding on stomata behavior and leaf gas exchange in barley plants. *Biologia Plantarum* 49(2): 317-319.
- Yu, F., Liang, K., Fang, T., Zhao, H., Han, X., Cai, M., & Qiu, F. (2019). A group VII ethylene response factor gene, *ZmEREB180*, coordinates waterlogging tolerance in maize seedlings. *Plant Biotechnology Journal*, 17(12), 2286-2298. <u>https://doi.org/10.1111/pbi.13140</u>
- Zhai, Y., Fan, Z., Cui, Y., Gu, X., Chen, S., & Ma, H. (2022). APETALA2/ethylene responsive factor in fruit ripening: Roles, interactions, and expression regulation. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 979348. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.979348
- Zhang Q, Liu X, Zhang Z, Liu N, Li D, Hu L (2019) Melatonin improved waterlogging tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by reprogramming polyamine and ethylene metabolism. *Frontiers in Plant Science* 10. <u>https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00044</u>
- Zhao, N., Li, C., Yan, Y., Wang, H., Wang, L., Jiang, J., Chen, S., & Chen, F. (2022). The transcriptional coactivator CmMBF1c is required for waterlogging tolerance in

Chrysanthemum morifolium. Horticulture Research, 9, uhac215. <u>https://doi.org/10.1093/hr/uhac215</u>

- Zubrycka, A., Dambire, C., Dalle Carbonare, L., Sharma, G., Boeckx, T., Swarup, K., Sturrock,
 C.J., Atkinson, B.S., Swarup, R., Corbineau, F., Oldham, N.J., Holdsworth, M.J. (2023).
 ERFVII action and modulation through oxygen-sensing in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, 14(1), 4665.
- Zúñiga, E., Magaña, V. (2018). Vulnerability and risk to intense rainfall in Mexico: The effect of land use cover change. *Investigaciones Geográficas*, (95). https://doi.org/10.14350/rig.59465