



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN RELATIVA Y CARACTERIZACIÓN DEL
GEN QUE CODIFICA PARA HSP70 EN PLÁNTULAS DE
VASCONCELLEA PUBESCENS SOMETIDAS A ESTRÉS TÉRMICO

AUTOR

TIFFANY YISELLE CEVALLOS VILATUÑA

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN RELATIVA Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN
QUE CODIFICA PARA HSP70 EN PLÁNTULAS DE *VASCONCELLEA*
PUBESCENS SOMETIDAS A ESTRÉS TÉRMICO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

PhD. Fabio Marcelo Idrovo Espín

Autora

Tiffany Yiselle Cevallos Vilatuña

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Análisis de la expresión relativa y caracterización del gen que codifica para Hsp70 en plántulas de *Vasconcellea pubescens* sometidas a estrés térmico con el estudiante Tiffany Yiselle Cevallos Vilatuña, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en Ciencias Biológicas: Biotecnología

CI: 1705952255

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Análisis de la expresión relativa y caracterización del gen que codifica para Hsp70 en plántulas de *Vasconcellea pubescens* sometidas a estrés térmico, del estudiante Tiffany Yiselle Cevallos Vilatuña, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Andrea Paola Cordero Arroyo

Máster en células madre y medicina regenerativa

CI: 1714669825

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Tiffany Yiselle Cevallos Vilatuña

CI: 1723122972

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres (Rosa y Marco), por apoyarme en cada paso y decisión tomada, por su paciencia y cariño a lo largo de mi vida universitaria. Gracias por confiar en mí.

Agradezco infinitamente al Dr. Fabio Idrovo, por la paciencia, el conocimiento, la oportunidad y sobre todo por brindarme sus consejos cuando más lo necesite. Gracias por enseñarme que sin duda, la adversidad forja el carácter.

De manera especial agradezco a Alejandra Garzón, por ser más que una colega, una amiga.

Agradezco al Ministerio del Medio Ambiente de Ecuador (MAE) por los permisos otorgados (MAE-DNB-CM-2017-0063)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre por sus consejos y apoyo. A mi padre por confiar en mí en cada momento. A mi hermano y a mí cuñada, por cada risa lograda y a mi pequeña Isabela, que sin duda fue, es y será mi momento de paz. A todos ellos por el amor, la ayuda, la comprensión, la sabiduría y la paciencia que me han hecho la persona que soy hoy en día.

RESUMEN

Únicamente el 3.5 % del área de la tierra global no está afectada por algún tipo de factor ambiental. El estrés abiótico impacta de forma significativa al crecimiento y desarrollo de las plantas. El aumento de la temperatura debido al calentamiento global tiene implicaciones negativas sobre los sistemas mundiales de producción de cultivos. Sin embargo, las plantas son organismos complejos capaces de desarrollar tolerancia ante diferentes factores de estrés. Teniendo en cuenta el interés creciente ante esta problemática y su impacto negativo en el rendimiento de los cultivos surge la necesidad de encontrar herramientas biotecnológicas que permitan ofrecer una solución. Se realizó el presente trabajo para analizar la expresión relativa y caracterizar el gen que codifica para Hsp70 en plántulas de *Vasconcellea pubescens* sometidas a estrés térmico. En primer lugar, se sembró semillas de *V. pubescens* hasta que alcanzaron un tamaño adecuado para el ensayo. De las plantas sembradas, 64 plántulas repartidas en dos repeticiones biológicas se sometieron a 25 °C, como temperatura control, y a 45 °C y 55 °C como temperaturas de estrés, durante 4 horas. El análisis de varianza (ANOVA), mostró significancia para los 2 de los 3 tipos de pruebas bioquímicas empleadas (fuga de electrolitos, actividad de la enzima catalasa y contenido de prolina). Todas las pruebas indicaron una respuesta termotolerante ante el ensayo de estrés térmico con temperaturas, consideradas extremas. A partir de los productos de RT-PCR obtenidos y el análisis de gel, se observó que existe mayor expresión del gen *HSP70* a medida que se incrementa la temperatura. De esta forma, se logró comprobar que el gen *HSP70* respondió en *V. pubescens* de igual manera que lo reportado para otras especies de plantas, y que, por lo tanto, este gen se sobre expresó en condiciones de estrés para otorgarle a la planta tolerancia ante la temperatura. Finalmente, el análisis bioinformático se realizó con el objetivo de proporcionar por primera vez una secuencia parcial de *HSP70*, así como su historia evolutiva en *V. pubescens*, una planta subutilizada, que podría presentar genes de interés que las plantas comerciales han perdido por efecto de la domesticación.

ABSTRACT

Only 3.5% of the global land area is not affected by some type of environmental factor. Therefore, abiotic stress significantly impacts the correct growth and development of plants. The increase in temperature due to global warming has negative implications on global crop production systems. However, plants are complex organisms, able to develop tolerance to different stress factors. Taking into account the growing interest arising from this kind of problem, its negative impact on crop fields and therefore the need to find biotechnological tools that enable us to offer a solution, the general objective of this work was to analyze the relative expression and to characterize the gene coding for HSP70 in seedlings of *Vasconcellea pubescens* subjected to thermal stress. First, seeds of *V. pubescens* were sown until they reached a suitable height for the trial. From the plants sown, 64 seedlings, distributed among two biological replicates, were subjected to 25 ° C, as control temperature, and to 45 ° C and 55 ° C as stress temperatures, in each case, for 4 hours. The analysis of variance (ANOVA), showed significance for the 3 types of biochemical tests used (electrolyte leak, catalase enzyme activity and proline content). All the tests indicated a thermotolerant response to the thermal stress test with temperatures, considered as extreme. From the RT-PCR products obtained and the gel analysis, a greater expression of the HSP70 gene was observed as the temperature increases. By means of this observation, it was possible to verify that HSP70 responded in *V. pubescens* in the same way as in the bibliography reported for other plant species. On a similar note, the HSP70 gene over expressed under stress conditions to award the plant tolerance to temperature. Finally, the bioinformatic analysis was carried out with the aim of elucidating, for the first time, a partial sequence of HSP70, as well as its evolutionary history in *V. pubescens*, an underutilized plant, which could present genes of interest that commercial plants have lost due to domestication.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Importancia de <i>Vasconcellea pubescens</i> como especie de estudio	1
1.1.2 Generalidades de Hsp70 y su relación en el aumento de temperatura.	2
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Justificación	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Descripción y generalidades de <i>Vasconcellea pubescens</i>	7
2.2 El cambio climático: Altas temperaturas y su efecto en el desarrollo de plantas.....	11
2.3 Generalidades de HSP y HSP70	13
2.4 Estrés oxidativo provocado en plantas bajo condiciones de estrés térmico.....	19
2.4.1 Fuga de electrolitos	21
2.4.2 Actividad de la enzima catalasa.....	21
2.4.3 Contenido de prolina.....	22
3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS.....	24
3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA	24
3.1.1 Material vegetal	24

3.1.1.1	Desinfección de semillas de <i>Vasconcellea pubescens</i>	24
3.2	Materiales y métodos para la obtención de datos	25
3.2.1	Diagrama de flujo.....	25
3.2.2	Ensayos de estrés térmico.....	27
3.2.3	Ensayos bioquímicos.....	27
3.2.3.1	Análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos.....	27
3.2.3.2	Análisis de la actividad de la enzima catalasa.....	28
3.2.3.3	Análisis del contenido de prolina.....	29
3.2.3.3.1	Curva estándar de prolina.....	29
3.2.3.3.2	Contenido de prolina para muestras.....	29
3.2.4	Ensayos moleculares.....	30
3.2.4.1	Extracción de ARN de hojas de plántulas de <i>V. pubescens</i>	30
3.2.4.2	Cuantificación de ARN.....	31
3.2.4.3	Tratamiento con ADNasa.....	31
3.2.4.4	RT-PCR.....	31
3.2.4.5	Gel de electroforesis y cuantificación relativa de la expresión de <i>HSP70</i>	32
3.2.4.6	Secuenciación de <i>HSP70</i>	32
3.2.5	Análisis bioinformático	33
3.2.5.1	Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	33
3.2.5.2	Modelamiento a proteína y creación de Weblogo.....	34
3.3	Evaluación Estadística de los resultados.....	34
4.	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1	Material vegetal.....	34
4.1.1	Desinfección de las semillas de <i>V. pubescens</i>	34
4.1.2	Siembra de semillas de <i>V. pubescens</i>	35
4.2	Ensayos de estrés térmico	36

4.3	Análisis de ensayos bioquímicos	39
4.3.1	Análisis del porcentaje de fuga de electrolitos	39
4.3.2	Análisis de la actividad de la enzima catalasa	43
4.3.3	Análisis del contenido de prolina	47
4.4	Análisis de los ensayos moleculares	52
4.4.1	Análisis de la cuantificación relativa del gen que codifica para Hsp70 y 18S.	52
4.4.2	Análisis del alineamiento de secuencias y filogenia	56
4.4.3	Análisis y modelamiento del polipéptido obtenido a partir de la secuencia de <i>VpHsp70</i>	60
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
5.1	Conclusiones	63
5.2	Recomendaciones	64
	REFERENCIAS	66
	ANEXOS	82

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Importancia de *Vasconcellea pubescens* como especie de estudio

Vasconcellea pubescens, también conocida como papaya de montaña o chilguacán (este último como término propio de Ecuador), es un árbol perteneciente a la familia Caricaceae, nativa de las regiones subtropicales de Sur América, en especial de las regiones altas de Colombia y Ecuador (Gaete-Eastman et al., 2009). Su fruto, sensorialmente atractivo, con un fuerte y característico aroma. Tiene un rendimiento promedio del 46 %, un contenido de azúcar de aproximadamente el 5 %, y un alto contenido en papaína. Posee importantes componentes nutricionales, incluyendo vitaminas A, B y C, antioxidantes y látex lechoso compuesto por proteasas, entre ellas cisteína endopeptidasa, enzima utilizada en las empresas alimenticias y farmacéuticas (Briones-Labarca, Plaza-Morales, Giovagnoli-Vicuña, & Jamett, 2015; Gaete-Eastman et al., 2009). Lo que le convierte en una especie con potencial alimenticio e industrial.

De igual forma, la enzima papaína se ha utilizado para tratar enfermedades como la arterioesclerosis y destruir el biofilm presente en la cavidad bucal (Mugita, Nambu, Takahashi, Wang, & Komasa, 2017). Según Baeza (1990), las enzimas proteasas presentes en *V. pubescens* presentan una actividad proteolítica 5 a 7 veces mayor a las enzimas encontradas en *C. papaya*. Asimismo, varios de sus compuestos fenólicos no han sido reportados, existiendo la posibilidad de que puedan proveer la actividad antioxidante en las células afectadas por especies reactivas del oxígeno (Simirgiotis, Caligari, & Schmeda-Hirschmann, 2009).

Los lugares con mayor diversidad genética de *Vasconcellea* son Ecuador, Colombia y Perú (Angel Rafael Morales Astudillo, Darwin Leonardo Medina Medina, 2004). Ecuador tiene al menos 16 de las 21 especies descritas para la familia Caricaceae (Peña, Villena, Aguirre, & Jiménez, 2017). Por lo tanto,

existe la posibilidad de que las especies de *Vasconcellea*, endémicas presenten un potencial genético que hasta el momento no ha sido mayormente estudiado.

1.1.2 Generalidades de Hsp70 y su relación en el aumento de temperatura.

La familia de genes que codifican para Hsp70 se divide en cuatro subfamilias, según su localización celular: citosol, retículo endoplasmático, mitocondria y plastidios (Guo et al., 2016). Los genes que codifican para este tipo de proteínas pueden acumular varias transcripciones después de que el organismo se somete a algún tipo de estrés. Cuando, finalmente el ambiente es más adecuado para el organismo los genes *HSP* son reprimidos nuevamente (X.-R. Wang et al., 2017).

Heat shock protein 70 (Hsp70), es una chaperona molecular que pertenece a la familia bien conservada de Heat shock proteins (HSPs) requeridas para el plegamiento de proteínas, modulación entre la interacción de proteínas, viabilidad celular y procesos de homeostasis proteica como la degradación y translocación de proteínas dañadas (Fragkostefanakis, Röth, Schleiff, & Scharf, 2015; Truman, 2017). También, esta involucrada en diversas funciones de distintos procesos celulares, por ejemplo, durante el crecimiento y desarrollo normal de la célula y periodos de estrés ambiental (Craig & Marszalek, 2017).

Hsp70 es una de las chaperonas más conservadas dentro de su familia, es ATP-dependiente, con un dominio ATPasa N-terminal de 44kD y un dominio para unión con el sustrato de 18kD, junto a un dominio variable terminal de 10kD (Guo et al., 2016). Varios miembros de Hsp70 están presentes en diferentes organismos, por ejemplo *Arabidopsis* tiene 18, *Oriza sativa* 32 y al menos 61 están presentes en *Glycine max* (Guo et al., 2016).

Usui (2015), realizó un estudio para identificar la expresión de *HSP70* en extractos de *Arnica montana* junto con la purificación y caracterización de inductores del mismo. Guo (2016) realizó un análisis genómico de la familia *HSP70* en *Capsicum annuum*, para distinguir las relaciones evolutivas con

otras especies. Por otro lado, debido a que Hsp interactúan con las proteínas que han sido dañadas plegándolas nuevamente, existen también, varios estudios en los cuales se explica su potencial como objetivos terapéuticos (Koizumi, Ohama, Mizoi, Shinozaki, & Yamaguchi-Shinozaki, 2014).

Según el IPCC (2014) la temperatura media global en la superficie terrestre aumentará de 1 a 3,7 °C para el final del siglo 21 debido al continuo aumento de los gases invernaderos, un efecto que no ha existido en los últimos 10 millones de años (Sage et al., 2015). Las plantas están comúnmente expuestas a cambios del medioambiente lo que resulta perjudicial, sin embargo al igual que otros organismos, pueden alcanzar estabilidad fenotípica a pesar de los cambios ambientales y variaciones genotípicas, proceso conocido como canalización (Jacob, Hirt, & Bendahmane, 2017).

El crecimiento y desarrollo de las hojas de las plantas es fuertemente regulado por la temperatura (Gray & Brady, 2016). En plantas de *Arabidopsis*, el crecimiento de la hoja así como su expansión se incrementa de forma lineal con la temperatura en un rango de 6 a 26 °C, sin embargo, al sobrepasar este rango, el crecimiento de la planta se ve afectado negativamente (Granier et al., 2002). De igual manera, el desarrollo de las raíces puede verse afectado directamente por el incremento de temperatura en el suelo o como una respuesta a los cambios fisiológicos que sufre la planta debido al calentamiento, por lo tanto, funciones como la respiración y toma de nutrientes se afectan (Gray & Brady, 2016). Adicionalmente, las plantas presentan un máximo de tolerancia a temperaturas altas, como en el caso de *Carica papaya* cuya temperatura óptima de crecimiento varía desde los 21 a 32 °C (Lange & Lange, 1961). Una temperatura mayor a 32 °C produce la caída de flores, lo que a su vez conlleva a que los frutos no puedan generarse (Lange & Lange, 1961).

La respuesta al estrés por calor induce la expresión y acumulación de Hsp, de tal forma que puedan proveer de termotolerancia a la planta. La desnaturalización de proteínas es una consecuencia directa o indirecta provocada por cualquier tipo de estrés. Heat shock protein (HSP) son

chaperonas requeridas cuando cualquier factor de estrés provoca un desplegamiento de las proteínas, por lo tanto son consideradas como amortiguadoras frente a factores ambientales y variaciones genéticas, esto debido a que minimizan el impacto que tienen las variaciones ambientales y genéticas sobre el proteoma (Carey, Gorman, & Rutherford, 2006) (Jacob et al., 2017).

1.2 Planteamiento del problema

El cambio climático, debido a variaciones en temperatura, precipitaciones, composición atmosférica, entre otros, es uno de los mayores problemas de estrés ambiental. Esto produce efectos negativos en diferentes tejidos y órganos dentro de las plantas, lo que conduce a una respuesta molecular, celular y morfológica que afecta el adecuado desarrollo de las mismas (Gray & Brady, 2016). Por otra parte, las actividades humanas en las que se incluyen la quema de combustibles fósiles y deforestación han aumentado la concentración de gases invernaderos como el CO₂. Se espera que este gas alcance una concentración entre los 730 y 1000 ppm para finales de este siglo ocasionando el aumento de la temperatura media global de la superficie terrestre de 1 a 3,7 °C para el final del siglo 21 (Gray & Brady, 2016). De igual manera, las plantas también experimentarán estrés por calor a medida que se eleve la frecuencia, intensidad y duración de las olas de calor. Las predicciones sobre el calentamiento climático varían según la región geográfica y cada especie vegetal se comportará de diferente manera (Gray & Brady, 2016). La respuesta de la planta frente a elevadas temperaturas depende de su etapa de crecimiento, por ejemplo. en el arroz, existe una biomasa vegetativa máxima cuando se alcanza los 33 °C, mientras que la formación de grano y el rendimiento se ven afectados negativamente por temperaturas superiores a 25 °C (Gray & Brady, 2016).

Hsp70 ha sido estudiada en diversos tipos de plantas como respuesta ante diferentes tipos de estrés. Un ejemplo es el estudio realizado en *Carica papaya* por Fabi (2012) en el que se analizó el transcriptoma de papaya relacionado con la maduración del fruto. En este ensayo se encontró que Hsp70 forma

parte del metabolismo de proteínas, aminoácidos, cuyo gen se sobre expresa bajo condiciones de estrés abiótico junto con otros genes de la familia heat shock como: *HSP18.1*, *HSP101*, *HSP20* y *HSP81.1*. Esto, nos otorga una idea de lo importante que puede ser el estudio de expresión del gen *HSP70*, así como, la proteína para investigaciones a futuro.

Adicionalmente, Hsp70, es una chaperona fundamental en la respuesta a cualquier tipo de estrés al inducir el re-plegamiento de proteínas dañadas, convirtiéndola en una proteína altamente estudiada a nivel vegetal y animal. El gen que codifica para Hsp70 si bien se expresa en condiciones normales, se sobre expresa también en condiciones de estrés (Guo et al., 2016). Sin embargo, en *V. pubescens* no existe evidencia de estudios de genes que codifican para Hsp70 ni de algún otro gen perteneciente a la familia heat shock bajo estrés.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Analizar la expresión relativa y caracterizar el gen que codifica para Hsp70 en plántulas de *Vasconcellea pubescens* sometidas a estrés térmico

1.3.2 Objetivos específicos

Evaluar el nivel de estrés térmico provocado en hojas de plántulas de *V. pubescens* mediante pruebas bioquímicas (actividad de la enzima catalasa, contenido de prolina libre y fuga de electrolitos).

Comparar los niveles de expresión relativa del gen *HSP70* en hojas de plántulas de *V. pubescens* sometidas y no sometidas a estrés térmico mediante RT-PCR en tiempo final.

Determinar la secuencia parcial del gen *HSP70*, para estructurar la historia evolutiva del mismo en *V. pubescens* a través programas bioinformáticos.

1.4 Justificación

El cultivo de *Vasconcellea* es subutilizado a pesar de su importancia, ya que podría representar una fuente de características deseables para la mejora de otras especies de la familia Caricaceae por los rasgos que presenta, como: tolerancia al frío, resistencia a enfermedades, sustancias proteolíticas, entre otros (Costa Rabelo et al., 2011; Scheldeman et al., 2011). Es así que, *Vasconcellea*, al seguir siendo una planta silvestre podría presentar genes de interés que las plantas comerciales han perdido por efecto de la domesticación. Estos genes podrían expresar proteínas resistentes a plagas, enfermedades o cambios climáticos como consecuencia de características adaptativas. Un estudio genético realizado en la familia Caricaceae indica una distancia genética elevada entre *Carica* y *Vasconcellea*, es decir, que ambas especies están escasamente relacionadas a nivel evolutivo por lo que, se sugiere que *C. papaya* pudo haber divergido de *Vasconcellea*, y fue separada al principio de la evolución creciendo de forma aislada en América central (Costa Rabelo et al., 2011).

Existe evidencia de que las plantas silvestres pueden poseer características superiores a las plantas comerciales. Un ejemplo es el caso del teosinte, el antecesor de *Zea maíz* o maíz comercial. Un estudio reciente realizado por Zavala-López (2018) en donde se evaluó la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de 22 antecesores del maíz entre ellos *Zea perennis* (teosinte) en comparación con 6 especies comerciales de maíz, dio como resultado que la capacidad antioxidante del Teosinte es mayor que la capacidad antioxidante del maíz comercial, por lo que concluyen que el potencial del Teosinte podría servir como un modelo para el mejoramiento del maíz moderno con la finalidad de ofrecer un potencial nutracéutico distinto (Zavala-López, López-Tavera, Figueroa-Cárdenas, Serna-Saldívar, & García-Lara, 2018). De igual manera, es el caso de *Solanum pennellii*, una planta silvestre que crece en climas áridos. Este tipo de tomate silvestre presenta extrema tolerancia al estrés abiótico. Esta característica hace que su germoplasma sea de suma importancia para el cultivo de tomate comercial

Solanum lycopersicum (Bolger et al., 2014), el mismo que es susceptible al aumento de temperatura. Por otra parte, la variación en la temperatura es un factor primario que afecta el correcto desarrollo de la planta así como su productividad a nivel industrial (Benlloch-González et al., 2016).

Debido a esto, es de utilidad encontrar genes en variedades silvestres que podrían mejorar la tolerancia de los cultivos. Para que sea posible identificar genes que presenten características deseables en *Vasconcellea pubescens* es necesario comenzar con un análisis de expresión de los mismos bajo determinadas condiciones como en este caso la expresión de *HSP70* bajo estrés térmico. También es necesario contar con las secuencias de estos genes de *Vasconcellea pubescens*, que hasta el momento no han sido reportadas y que podrían ser de suma importancia para generar plantas resistentes a cambios climáticos bruscos en un futuro cercano. Al existir estudios previos realizados en la Universidad de las Américas sobre estrés térmico en *Vasconcellea pubescens* se plantea continuar con el proyecto de manera que se pueda elucidar por primera vez la expresión génica relativa del gen *HSP70* en tiempo final así como, la secuencia del gen perteneciente a *V. pubescens*.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción y generalidades de *Vasconcellea pubescens*.

La familia Caricaceae está compuesta de 6 géneros y 35 especies de las cuales, 32 son dioicas, es decir, plantas unisexuales que requieren ejemplares de distinto sexo para poder llevar a cabo la reproducción mediante la polinización (Wu et al., 2010). Todos los miembros de la familia Caricaceae poseen laticíferos, que son pequeñas estructuras capaces de secretar látex (Scheldeman et al., 2011). Las plantas liberan látex como mecanismo de defensa ante depredadores o cuando presenta daños en su estructura para cicatrizar la herida (Fu et al., 2015; Konno et al., 2004). El látex es una mezcla de proteinasas y quitinasas, la enzima más importante y estudiada es la papaína (El Moussaoui et al., 2001). La papaína es utilizada como aclarador

natural en la industria de la cerveza y en la industria alimenticia como ablandador de carne, en la preparación del queso y para el enriquecimiento proteico de cereales (Scheldeman et al., 2011).

La papaína también ha sido estudiada dentro de la industria farmacéutica para aplicaciones médicas. Se ha evidenciado que puede reducir el biofilm bacteriano oral de sujetos ancianos, el cual, con el tiempo representa un potencial reservorio para infecciones respiratorias (Mugita et al., 2017). Su uso para el tratamiento de fibrosis de la piel, una enfermedad en donde el tejido estructural normal de la piel es reemplazado por tejido conectivo fibroso disfuncional como consecuencia de un proceso de reparación del tejido normal, también ha sido evaluado con éxito (Sahu, Kaurav, & Pandey, 2017). *Vasconcellea pubescens*, como miembro de la familia Caricaceae, presenta un alto contenido de papaína en su fruto (Moya-León, Moya, & Herrera, 2004). De igual forma, el látex contiene cisteína proteasa, cuya actividad proteolítica se ha reportado que es de 5 a 7 veces mayor a las enzimas encontradas en *C. papaya* (Baeza, Correa, & Salas, 1990).

Vasconcellea es un cultivo adaptado a temperaturas medias (18 °C a 22 °C) con preferencia a grandes altitudes y precipitaciones (Schedelman et al., 2011). Por lo general este tipo de planta puede cultivarse desde los 800 a 1400 metros sobre el nivel del mar. Se distribuye en varios países de América Latina, entre los que se encuentran: Ecuador, Colombia, Perú, Brasil, Chile, México, Bolivia, Venezuela y Costa Rica. Sin embargo, fue introducida en Nueva Zelanda en 1973 de donde se extendió hasta Italia, España, Canadá, Sur África y Holanda (Schedelman et al., 2011). *Vasconcellea* constituye también el género más grande dentro de la familia Caricaceae con 21 especies. En Ecuador están presentes 16 especies, algunas de ellas endémicas, por lo que son incluso, más vulnerables a la extinción y erosión genética. Dentro de las especies consideradas en peligro de extinción se encuentran, *V. omnilingua* y *V. horovitziana*, ambas especies endémicas del país (Scheldeman et al., 2011) (Peña et al., 2017).

A pesar de sus amplias condiciones de cultivo y su importancia agronómica y fitogenética su cultivo es subutilizado, es decir, no es considerado un estudio de primer nivel de atención. Su fruto, a nivel local, es consumido y procesado para jugos, mermeladas, conservas, productos diarios, entre otros. Sin embargo, la especie más importante cultivada en Ecuador es el babaco (*V. heilbornii*), un híbrido estéril formado por el cruce de *V. stipulata* y *V. pubescens* (Aradhya & Manshardt, 1999). Por otro lado, *V. pubescens* es mayormente cultivada en Colombia, seguido de Ecuador, aun así, esta especie no representa mayor importancia para el sector agrícola, por lo que el estudio de este tipo de especie llega a ser poco valorado.



Figura 1. Distribución de *Vasconcellea* en América Latina. Las áreas más intensas indican la mayor cantidad de especies del género *Vasconcellea*.

Tomado de Schedelman (2007).

Vasconcellea pubescens (con sus sinónimos *Vasconcellea cundinamarcensis* o *Carica pubescens*) conocida también como papaya de montaña es una planta diploide ($2n=2x=18$), es decir compuesta por 9 pares de cromosomas, (Aradhya & Manshardt, 1999) que puede llegar a alcanzar hasta los 8-10 metros de alto con ramificaciones que contienen frutos amarillos con forma ovoide (Simirgiotis et al., 2009). A diferencia de *C. papaya* que presenta un ovario unilocular, esto es, que presenta un solo lóculo en el ovario de la flor, *Vasconcella* presenta

ovarios pentaloculares (Aradhya & Manshardt, 1999). La mayoría de las especies pertenecientes a *Vasconcellea* son estrictamente dioicas y no presentan flores bisexuales. Sin embargo, *V. pubescens* es una planta polígama, es decir, posee flores bisexuales y flores unisexuales masculinas y femeninas en la misma planta. En raras ocasiones puede presentar flores andromónicas, flores que pueden ser hermafroditas y unisexuales masculinas por separado dentro de la misma planta, una característica que comparte con *C. papaya* (Scheldeman et al., 2011). Puede comenzar a producir frutos a partir de los dos años, un solo árbol es capaz de producir de 50 a 60 frutos por año. Los frutos de *Vasconcellea* poseen un diámetro de 5 a 6 cm con 6 a 14 cm de largo con una gran cantidad de semillas localizadas en la cavidad central del fruto (Fig. 2) (Simirgiotis et al., 2009). La pulpa presenta un color blanco-amarillento, sensorialmente atractiva y con un fuerte y característico aroma. Las semillas contienen una gran cantidad de alcoholes, cetonas, aldehídos y metabolitos secundarios como: fenoles, ácidos y flavonoides (Briones-Labarca et al., 2015) que podrían ser objeto de estudio. Su fruto es climatérico (Moya-León et al., 2004), es decir que puede alcanzar la maduración incluso después de haber sido recolectado.



Figura 2. Fruto perteneciente a *V. pubescens*. Propio de la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia de Sangolquí.

2.2 El cambio climático: Altas temperaturas y su efecto en el desarrollo de plantas

El incremento de gases invernaderos principalmente el CO₂, junto con el CH₄, N₂O, O₃, entre otros, ocasionarán un incremento en la temperatura global de la superficie terrestre (Overdieck, 2016). Según el IPCC (2014), las últimas tres décadas antes del año 2013 han sido sucesivamente más calientes. Por ejemplo, en la estación de Berlín, Dahlem, la temperatura global de la superficie terrestre desde el año 1951 hasta el año 1979 incrementó 0,214 °C por década y desde el año 1979 hasta el año 2012 incrementó 0,429 °C por década (Overdieck, 2016). La principal causa del calentamiento global es la acumulación de CO₂, el cual se espera que aumente durante los 2010 y 2020 (IPCC, 2014). Se prevé que las olas de calor sean más intensas, frecuentes y duraderas de lo que se conoce actualmente (Meehl et al., 2007). Generalmente la variación de la temperatura del aire sigue patrones relacionados con la altitud, la misma que está asociada con la disminución de la presión atmosférica. Por ende, para biólogos o biotecnólogos, es común confiar en datos meteorológicos para poder describir las condiciones de vida de una determinada planta o, modelar el nicho de una especie de planta según las condiciones abióticas, como la temperatura (Box, 2016; Körner & Hiltbrunner, 2018).

La temperatura junto con la disponibilidad de agua, son los principales factores abióticos que afectan el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas y vegetación (Box, 2016). Las plantas pueden adaptarse a distintos rangos de temperatura entre ambientes fríos o calientes. Un rango de temperatura fisiológicamente óptimo para la planta, permitirá que eventos como, la germinación, floración y desarrollo en general, no se vean negativamente afectados. Temperaturas fuera de este rango comprometerán la supervivencia de la planta y se las denomina como umbrales críticos o temperaturas extremas (Bahuguna & Jagadish, 2015). A diferencia de otros tipos de estrés abiótico el cambio de temperatura puede percibirse al mismo tiempo en todos los componentes celulares debido a la presencia de termosensores, que son

capaces de detectar cambios de temperatura y activar señales de respuesta (Bahuguna & Jagadish, 2015).

Las altas temperaturas influyen negativamente en los procesos bioquímicos de las plantas, en especial en la fotosíntesis, respiración celular y conductancia estomática (Overdieck, 2016). Cada planta tiene su propio rango de temperatura mínimo, máximo y óptimo para su crecimiento y desarrollo. También presentan una temperatura óptima tanto para su desarrollo vegetativo como para su desarrollo reproductivo, por lo general, en la mayoría de las plantas, la temperatura óptima para el desarrollo vegetativo es mayor que para el desarrollo reproductivo.

Temperaturas altas durante la fase reproductiva de la planta afectan a la viabilidad del polen, fertilización, y formación del grano o fruto (Hatfield & Prueger, 2015). Los efectos del cambio climático son evidentes cuando se refiere a la productividad de los cultivos, debido a que este parámetro representa el componente de mayor preocupación para los productores y consumidores. Por ejemplo, temperaturas superiores a los 30 °C causan daños en la división celular y en la replicación de amiloplastos de los granos de maíz, lo que, reducirá el tamaño del grano y la productividad del cultivo (Commuri & Jones, 2001). En el arroz se observa un comportamiento similar, cuando la temperatura excede los 33 °C la viabilidad y producción del polen disminuye pero si sobrepasa los 40 °C la producción de polen se detiene por completo (Hatfield & Prueger, 2015). La temperatura umbral documentada para alcanzar esterilidad en el arroz es de 33 °C (Jagadish, Craufurd, & Wheeler, 2008). Sin embargo, la morfología de la planta y procesos como: extracción de nutrientes, interacciones microbianas, entre otras, son determinados por la temperatura del suelo (BassiriRad, 2000). Cambios en la temperatura del suelo pueden afectar la membrana plasmática de las células de la raíz, así como la energía cinética de los iones inorgánicos libres presentes en el suelo, lo que limitará la disponibilidad y absorción de nutrientes (BassiriRad, 2000). Los procesos del desarrollo de la planta están determinados tanto por la temperatura del aire como por la del suelo y la interacción del fotoperíodo.

2.3 Generalidades de HSP y HSP70

Los genes *HSP* se expresan de manera diferencial como respuesta a distintos factores de estrés (Wang et al., 2012). La acumulación de las proteínas de choque térmico o con sus siglas en inglés (Hsp), ocurre cuando la expresión de sus genes se desencadena por el calor o por cualquier otro tipo de estrés (Zhang et al., 2015).

Hsp son proteínas descritas originalmente por su relación con el estrés térmico de plantas y animales. Sin embargo, actualmente se sabe que la inducción de la expresión de Hsp puede deberse a distintos tipos de estrés abiótico, entre ellos: exposición al frío, radiación a la luz UV, remodelación de tejidos, reparación de heridas e inclusive estrés biótico (Park & Seo, 2015). Como proteínas chaperonas están involucradas en el plegamiento, ensamblaje, translocación y degradación de proteínas durante el crecimiento y desarrollo normal de las células, incluyendo la estabilización de polipéptidos y membranas (Park & Seo, 2015; Scarpeci, Zanor, & Valle, 2008). También proveen de citoprotección a la célula al replegar proteínas que han sido dañadas y modular las respuestas celulares inmunes (Calderwood & Asea, 2016). Por lo tanto, son esenciales para la homeostasis celular en condiciones óptimas, así como, en condiciones de crecimiento adversos (Wang, Vinocur, Shoseyov, & Altman, 2004).

Hsp comprenden varias clases de familias que se clasifican según su peso molecular. Existen cinco familias principales en plantas denominadas: HSP70, HSP100, HSP90, HSP60 y HSP20 o conocidas como proteínas de choque térmico pequeñas (Hsps), ya que tienen pesos moleculares que comprenden desde los 15 kDa a 42 kDa, (Calderwood & Asea, 2016) (Vierling, 1991). Hsps comprende la mayor clasificación de Hsp cuya expresión se induce durante el estrés por calor en plantas y bajo otros tipos de estrés abiótico (Calderwood & Asea, 2016). Son proteínas que se encuentran activas en todos los dominios de vida, es decir, procariotas, eucariotas y arqueas. Su estructura primaria comprende una región N-terminal variable, una región C-terminal más conservada y una extensión C-terminal altamente conservada, esta última es

referida como el dominio cristalino alfa (ACD) o dominio HSP20 con ~90 aminoácidos. Son codificadas por seis familias de genes en plantas, cuyas secuencias varían según la localización dentro de la célula: citosol, retículo endoplasmático, cloroplasto y mitocondria (Waters, Lee, & Vierling, 1996), por lo que, Hsps, que cumplen su función en distintos organelos de la célula o compartimientos, tienen secuencias de señal en su región N-terminan que permiten que la misma se dirija al compartimiento u organelo celular adecuado. La extensión C-terminal puede presentar bastantes variaciones en su cadena aminoacídica por lo que puede contener motivos de aminoácidos específicos para cada organelo (Waters, 2013). La expresión de los genes para Hsps se limita a cuando existe estrés ambiental, sin embargo, en ausencia de este, se ha evidenciado que su expresión es restringida a ciertos estadios de crecimiento de las plantas como: embriogénesis, germinación, maduración del fruto y el desarrollo de granos de polen (Sun, Van Montagu, & Verbruggen, 2002). La transcripción de estos genes es llevada a cabo por proteínas reguladoras denominadas factores de transcripción de estrés térmico o por con sus siglas en inglés (HSF). Estos factores de transcripción, localizados en el citoplasma, han sido clasificados en 3 clases diferentes según su estructura en los dominios de la proteína: HSFA, que incluye HSFA1 y HSFA2, HSB y HSFC. La expresión de Hsps varía según el tipo de planta (Al-Whaibi, 2011). Plantas de mayor tamaño pueden presentar al menos 20 tipos de Hsps, aun así, una solo especie de planta puede contener 40 tipos de Hsps (Vierling, 1991).

Hace más de 50 años, Ritossa (1962) descubrió que las HSP se acumulaban en *Drosophila melanogaster* como respuesta al choque térmico y de ahí su nombre. Apartir de ese momento, estas proteínas han sido descritas para distintos tipos de organismos en los que se incluyen, *Echerichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y humanos (Vierling, 1991). La respuesta de Hsp en diferentes organismos demuestra que la proteína es altamente conservada por dos razones importantes, la primera: el mecanismo molecular que se induce por calor presenta varias similitudes entre eucariotas y segunda, la mayoría de Hsp son homologas entre eucariotas, de igual manera se han identificado proteínas homólogas entre procariotas (Vierling, 1991). La conservación en la

evolución que mantienen estas proteínas evidencia que su expresión es fundamental y esencial para la célula.

Hsp se localizan generalmente en el citoplasma de la célula, a su vez, están involucradas en la transferencia de señales celulares al núcleo cuando se experimentan condiciones de estrés. Se ha comprobado que también están presentes bajo condiciones de estrés biótico, por lo tanto se expresan cuando el sistema inmune se ve afectado (Park & Seo, 2015). Por ejemplo, Hsp90 funciona como un regulador positivo del sistema inmune de la planta, por lo que puede interactuar con proteínas R o quitinasas, así como, factores de transcripción que activan respuestas de defensa en la planta (Calderwood & Asea, 2016). De igual manera, Hsp70 también está presente cuando la planta ha sufrido patogénesis microbiana, principalmente, durante las infecciones virales (Hafren, Hofius, Ronnholm, Sonnewald, & Makinen, 2010).

Hsp70 es una de las cinco familias principales que pertenece al grupo de Hsp. Es altamente conservada tanto en animales como en plantas y está codificada por una familia multigénica que puede expresarse tanto durante el desarrollo normal de la planta, así como, bajo condiciones de estrés abiótico y biótico (Calderwood & Asea, 2016). También se ha encontrado que está presente como una chaperona ATP-dependiente, de esta forma evita la acumulación de agregados y asegura un plegamiento de proteínas adecuado, hasta que la misma llegue a su ubicación final (Park & Seo, 2015). Bajo condiciones de estrés Hsp70, mantiene la calidad de la proteína al evitar que agregados de proteínas dañadas se formen (Fig. 3) (Sarkar, Kundnani, & Grover, 2013).

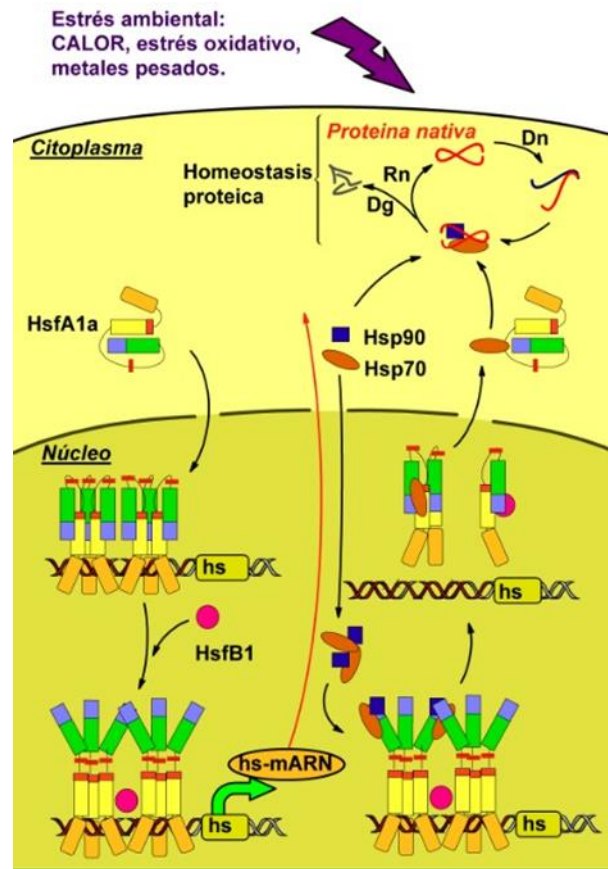


Figura 3. Proteínas Hsp. Las proteínas nativas expuestas a calor tienen un ciclo, pueden desnaturalizarse (Dn), re-naturalizarse (Re) (por la acción de Hsp90 y 70) o degradarse. Por otro lado, los factores transcripcionales HsfA1a que se encuentran en el citoplasma, eventualmente ingresan al núcleo donde forman trímeros. Sin embargo, si no existe el estímulo, los genes que responden al calor tipo heat stress no se activan pero si existe aumento de temperatura el cofactor HsfB1 activa al oligómero de Hsf y los genes con respuesta al calor se expresan. Por otro lado, para silenciar el gen las chaperonas Hsp90 y 70 ingresan al núcleo, cambian la conformación del oligómero de factores transcripcionales y se separan del promotor del gen (hs), se depolimerizan y salen los monómeros de hsf.

Tomado de (Morimoto, 1998).

La mayor información sobre estructura y función de Hsp70 ha sido obtenida a partir de organismos como: *E. coli*, levaduras y células de mamíferos. A pesar de que la estructura de este tipo de proteínas es altamente conservada, la

familia de Hsp70 en plantas, presenta especies de esta proteína específicas para cada planta. Varios miembros de Hsp70 están presentes en diferentes especies, por ejemplo *Arabidopsis* tiene un total de 18, *Oriza sativa* presenta 32 y al menos 61 están presentes en *Glycine max* (Calderwood & Asea, 2016; Guo et al., 2016).

Por otra parte, la estructura de Hsp70 consiste en un dominio de unión al nucleótido o dominio ATPasa (~44kDa), un dominio de unión al sustrato (~18kDa) y una región C-terminal variable (~10kDa), esta última región ayuda a unir los sustratos al dominio de unión al sustrato. Hsp70 requiere de dos proteínas chaperonas del dominio J y factores de intercambio de nucleótidos con sus siglas en inglés (NEF) para su función. La unión de las proteínas del dominio J, estimulará la hidrólisis de ATP, esta a su vez ayudará al atrapamiento de la región hidrofóbica del sustrato en la conformación, ahora cerrada, del dominio de unión al sustrato. Los NEF facilitan el intercambio de ATP-ADP catalizando la liberación de ADP de Hsp70, esto provoca la conformación abierta de Hsp70 y por consiguiente la liberación del sustrato (Sarkar et al., 2013). El dominio o región C-terminal contiene un estructura circular alfa, que funciona como una “tapa” para el dominio de unión al sustrato, cuando el ATP se une a HSP70, la tapa se abre, los péptidos se mantienen juntos y se liberan, por el contrario el ADP, cierra la tapa y los péptidos logran unirse al dominio de unión al sustrato (Mayer, 2010). Hsp70 en plantas, se clasifica según su localización en 4 grupos diferentes (en paréntesis se indican las secuencias conservadas): citosol (GPKEEVD), retículo endoplasmático (HDEL), plastidios (PEGDVIDADFTDSK) y mitocondria (PEAEYEEAKK) (Guy & Li, 1998).

A pesar de que Hsp70 posee funciones vitales para la célula y que a su vez representa importancia fisiológica y agronómica, el análisis funcional de Hsp70 en plantas es limitado debido a tres razones en específico: (i) existe una redundancia de genes, lo que limita el análisis genético, (ii) letalidad de mutantes y (iii) la ausencia de inhibidores específicos y eficientes. Por estas

razones el conocimiento sobre las contribuciones que hace Hsp70 a las rutas metabólicas de eucariotas, en especial de plantas, es escaso.

Plantas transgénicas que sobre expresan Hsp70 surgieron como una herramienta para poder dilucidar las funciones de dicha proteína en diversas plantas, incluyó *Arabidopsis* (Calderwood & Asea, 2016). Hsp70 también actúa como un motor que conduce la translocación de proteínas al cloroplasto, retículo endoplasmático y mitocondrias. En el citosol proteínas desplegadas que van hacia su orgánulo respectivo, pueden convertirse en proteínas citotóxicas y agregados inespecíficos si logran acumularse en grandes cantidades. Por lo tanto la orientación postraduccional a organelos endosimbóticos como las mitocondrias y cloroplastos requiere que los niveles de los precursores se mantengan dentro de los límites para no dar lugar a la formación de agregados inespecíficos. A su vez, el mecanismo regulador del citosol no debe desequilibrar la cantidad de proteínas correspondiente para cada organelo. Dentro de las estrategias desarrolladas por la célula para mantener este tipo de regulación se encuentran las funciones de Hsp70 (Calderwood & Asea, 2016; Su & Li, 2010).

Las altas temperaturas afectan numerosos procesos biológicos en todos los organismos, cuando esto ocurre se activa un mecanismo denominado respuesta de choque térmico HSR (de sus siglas en inglés, Heat Shock Response). Como consecuencia, las células están protegidas del daño severo ya que reanudan las actividades celulares normales, lo que resulta en un mayor nivel de termo tolerancia adquirida por el organismo. El mecanismo de HSR logra retomar las actividades celulares normales mediante la inducción rápida y específica de Hsp (Calderwood & Asea, 2016). Por otro lado, la conservación evolutiva de Hsp y su correlación con la resistencia celular a altas temperaturas, propone que la acumulación de HSP lleva a aun aumento de termo tolerancia en los organismos (Calderwood & Asea, 2016; Sørensen, Kristensen, & Loeschcke, 2003).

La expresión de genes que codifican para Hsp70 muestra diversas respuestas ante el calor, esta variación en la expresión puede asociarse a los elementos

cis ubicados en el dominio promotor, que a su vez regulan la expresión de estos genes. Los genes que codifican para Hsp70 poseen elementos de choque térmico en sus promotores, en consecuencia, estos genes han estado y están involucrados en el desarrollo de termo tolerancia en plantas (Sarkar et al., 2013). La expresión de Hsp se incrementa cuando la temperatura comienza a elevarse. La temperatura de síntesis máxima para HSP dependerá de cada especie de planta y de su temperatura óptima de crecimiento, por lo que se sugiere, que la respuesta de Hsp está ajustada a la fisiología de cada organismo (Vierling, 1991). Distintos organismos, en lo que se incluyen plantas, que han desarrollado termotolerancia, generalmente por pre tratamientos con temperaturas no letales, se han relacionado debido a que las condiciones para adquirir tal característica han expresado la síntesis de Hsp. Por lo tanto Hsp se correlaciona con el desarrollo de termotolerancia (Vierling, 1991).

2.4 Estrés oxidativo provocado en plantas bajo condiciones de estrés térmico.

Las variaciones de temperatura junto con otros factores ambientales, producen consecuencias determinantes para el crecimiento y supervivencia de los cultivos. Según la FAO, el 70 % de la superficie terrestre es afectada por algún tipo de estrés ambiental (Cramer, Urano, Delrot, Pezzotti, & Shinozaki, 2011) (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). Entre estos se incluye las temperaturas extremas, que en la actualidad generan un creciente interés debido al impacto negativo que provoca en los rendimientos de los cultivos en un escenario en donde existe una reducción continua de tierras cultivables y recursos hídricos (Lobell, Schlenker, & Costa-Roberts, 2011).

Por otra parte, diferentes tipos de estrés ambiental, entre ellos la temperatura, generan la producción de especies reactivas del oxígeno, ROS (de sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species), lo que ocasiona la interrupción de la homeostasis celular y daños oxidativos en la planta (Gupta, Palma, & Corpas, 2015)

Las respuestas que generan las plantas ante el estrés abiótico, dependen de cada especie, así como del lugar: tejido u órgano. Para sobrevivir ante estas condiciones de estrés abiótico, las plantas han desarrollado diferentes sistemas de comunicación que incluyen interacciones con rutas moleculares en las que las señales del orgánulo y tales interacciones bajo condiciones de estrés representan una de las principales respuestas de defensa de la planta (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). La generación de ROS es la respuesta molecular más común y rápida cuando se presenta estrés abiótico. Temperaturas extremas inducen la producción de ROS, que en condiciones normales, cumplen funciones importantes para el crecimiento y desarrollo de la planta, así como también están involucrados en la detección de señales ambientales (Foyer & Noctor, 2013).

Sin embargo, la exposición a condiciones de estrés provoca la desregulación e incluso la ruptura de la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias y cloroplastos, lo que provoca la acumulación de ROS afectando a los tejidos y órganos de las plantas de manera negativa. Productos como: O_2^- , $\cdot OH$, H_2O_2 , son los principales componentes generados y son fuertemente oxidantes cuya acumulación es perjudicial para la integridad de la célula. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) constituye el producto más estable de ROS, formado en la reacción del oxígeno singlete (1O_2) y el radical superóxido (O_2^-) (Foyer & Noctor, 2009). La detoxificación de ROS es esencial para la protección de los orgánulos frente al daño oxidativo causado bajo condiciones de estrés. Temperaturas extremas, altas y bajas, inducen daños significativos en la estabilidad de la membrana, fotosíntesis y respiración de las plantas (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). Altas temperaturas provocan el daño de las células a través de la acumulación de ROS debido a la disminución de la actividad antioxidante en los tejidos de las plantas (Mittler, Vanderauwera, Gollery, & Van Breusegem, 2004), por lo tanto la tolerancia adquirida por las plantas se basa, en parte, por un aumento en el sistema de detoxificación de ROS (Jha, Bohra, & Singh, 2014).

2.4.1 Fuga de electrolitos

La membrana celular es una de las principales estructuras que se ve afectada por los diferentes tipos de estrés abiótico. Por lo tanto, mantener la integridad y estabilidad de la membrana, es una característica de las plantas para adquirir tolerancia frente al estrés ambiental (Bajji, Kinet, & Lutts, 2002). La pérdida de electrolitos, es una prueba que permite medir el daño causado a las membranas celulares de las plantas cuando han sufrido algún tipo de estrés abiótico, como: bajas o altas temperaturas, contaminación del aire, estrés salino, metales pesados, entre otras. Este tipo de prueba es incluso utilizado para medir el daño causado por estrés biótico (Bajji et al., 2002).

Los primeros estudios realizados en medir la pérdida de electrolitos sugirieron que la fuga de electrolitos estaba relacionada con el daño de la membrana celular, que a su vez provoca la muerte celular. Se ha demostrado que medir el daño causado en la membrana celular, puede relacionarse con distintos parámetros fisiológicos y bioquímicos que condicionan las respuestas de las plantas ante las condiciones ambientales. Por ejemplo, síntesis de enzimas oxidativas, concentración de lípidos en la membrana, resistencia estomática, potencial osmótico, entre otros (Bajji et al., 2002; Garty et al., 2000). Por esta razón, esta prueba se considera como un criterio de importancia para identificar cultivos resistentes a estrés abiótico. Estudios han demostrado que la pérdida de electrolitos está relacionado con la salida del ion K^+ , el mismo que es abundante en las células vegetales. La fuga de electrolitos siempre va acompañado con la generación de especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), capaz de activar el flujo de K^+ (Demidchik et al., 2014).

2.4.2 Actividad de la enzima catalasa

Existen diversas enzimas que cumplen su función como antioxidantes entre estas se encuentran: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, cada una de estas moléculas poseen isoenzimas presentes en todos los

compartimientos celulares que proporcionan un sistema eficiente para degradar ROS (Gupta, Palma, & Corpas, 2015)

La enzima catalasa se descubrió por primera vez en 1900 por el científico Oscar Loew, a su vez, fue la primera enzima antioxidante en ser descubierta. Su nombre se debe a la acción catalítica que ejerce sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), forma parte del grupo de enzimas denominadas oxidorreductasas y está encargada de la descomposición del H_2O_2 en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). Esta enzima está codificada por 3 genes: CAT1, CAT2, y CAT3 y es indispensable para la eliminación de ROS durante condiciones de estrés (Gill & Tuteja, 2010; Hu et al., 2010). H_2O_2 , posee una vida relativamente larga y alta permeabilidad a través de las membranas (Yang & Poovaiah, 2002). En plantas, la catalasa descompone el H_2O_2 generado durante la β -oxidación de ácidos grasos, la oxidación fotorespiratoria y durante el transporte de electrones en la membrana mitocondrial (Yang & Poovaiah, 2002). La catalasa posee una afinidad baja por el sustrato H_2O_2 , es necesario que dos moléculas de H_2O_2 entren simultáneamente en el sitio activo de la enzima. Por esta razón, la enzima catalasa es responsable de la descomposición y control de altas cantidades de H_2O_2 que se presentan cuando existe algún tipo de estrés abiótico en las plantas. En las células de las plantas la catalasa está presente principalmente en los peroxisomas, también existen en la mitocondria y en el citoplasma y juega un papel importante al mantener el equilibrio redox celular (Gupta, Palma, & Corpas, 2015; Yang & Poovaiah, 2002). La catalasa presenta altas tasas de rotación, una sola molécula de la enzima puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de peróxido por minuto (Gill & Tuteja, 2010).

2.4.3 Contenido de prolina

Al igual que las enzimas, existen compuestos capaces de actuar como antioxidantes no enzimáticos, como por ejemplo: carotenoides, polifenoles como los flavonoides, glutatión, ascorbato y algunos solutos compatibles como la prolina. Estos compuestos presentan un potencial de reducción del estrés

oxidativo incluso más alto que los compuestos enzimáticos (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). La prolina es uno de los aminoácidos que forma parte de las proteínas los seres vivos. En las plantas la prolina tiene 2 vías de síntesis: a través de la vía del glutamato y a través de la vía de la ornitina (Hayat et al., 2012). La acumulación de prolina libre en plantas bajo condiciones de estrés está determinada por la activación de las vías de síntesis de prolina y por la degradación catabólica de las proteínas (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). Se ha sugerido que la acumulación de prolina en plantas puede estar involucrada en la obtención de tolerancia ante diferentes tipos de estrés abiótico (Hayat et al., 2012). La prolina puede actuar como una molécula chaperona que ayuda a mantener la integridad de las proteínas, de igual manera, varios estudios sugieren que este tipo de aminoácido actúa como antioxidante al combatir ROS y como silenciador del oxígeno singlete (1O_2) (Hayat et al., 2012; Matysik, Alia, Bhalu, & Mohanty, 2002). Por lo tanto, la acumulación de prolina libre en plantas sometidas a un tipo de estrés abiótico, a diferencia de la ausencia de este aminoácido en plantas normales, constituye una importancia fisiológica para la planta. Se considera a la prolina como un componente crítico del mecanismo de tolerancia al estrés abiótico (Deinlein et al., 2014). Además los compuestos fenólicos constituyen grupos numerosos de metabolitos secundarios en las plantas, este tipo de moléculas en especial los flavonoides, son considerados como los antioxidantes más importantes para las plantas. Asimismo, la producción de estos compuestos está directamente relacionada con la prolina, la misma que, induce la síntesis de sus precursores a través de la vía de las pentosas fosfato (Hare & Cress, 1997).

3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.1.1 Material vegetal

3.1.1.1 Desinfección de semillas de *V. pubescens*

Los frutos maduros de *Vasconcellea pubescens* para las respectivas pruebas bioquímicas y análisis de expresión del gen *HSP70* fueron colectados en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia de Sangolquí.

Los frutos fueron lavados con agua y jabón líquido para posteriormente sumergirlos en una disolución de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de desinfección, los frutos se lavaron con agua para retirar cualquier rastro de solución restante. Una vez secos, se procedió a extraer las semillas localizadas en la cavidad central de los mismos dentro de la cámara de flujo laminar NuAire-AireGard™. El mucílago que recubría las semillas se retiró con la ayuda de pinzas y bisturí sin dañar la semilla. Una vez extraídas la cantidad de semillas necesarias, las mismas se trataron con 50ml de alcohol al 96% durante 5 minutos con agitación continua. Finalmente para remover el alcohol restante se realizaron 3 lavados con agua destilada tipo II con agitación continua. Las semillas, ya lavadas, se secaron dentro de la cámara con flujo laminar por el tiempo de una hora. Transcurrido este tiempo, un total de 500 semillas fueron almacenadas en tubos para centrifuga de 50ml a temperatura ambiente hasta su posterior siembra.

3.1.1.2 Siembra de semillas de *V. pubescens*

Para sembrar las semillas de *V. pubescens* se utilizaron 50 vasos de polietileno de 8 oz cada uno. En cada vaso se colocó aproximado de 60 g de tierra comercial, cada uno de los vasos contenía 5 semillas de la especie en estudio colocadas con una pinza autoclavada previamente, a una profundidad de 2 cm aproximadamente. Durante un periodo aproximado de 17 semanas, las semillas fueron regadas cada 72 horas con 30 ml de agua destilada tipo II. El fertilizante marca FORZA se utilizó durante las primeras 4 semanas, hasta la

germinación de la semilla. Se regaron con 3 0ml de solución de fertilizante orgánico al 0,12 % cada 120 horas, para ayudar a la germinación de la semilla. Los vasos que contenían las semillas se dejaron en el laboratorio con luz artificial a temperatura ambiente (~25 °C) con un fotoperiodo de 12 horas con luz y 12 horas sombra. Para la segunda repetición se utilizó el mismo protocolo con el mismo número de vasos y semillas en cada uno de ellos, con diferencia de un mes de siembra. Se sembró un total de 500 semillas (5 semillas por vaso) que se mantuvieron dentro del laboratorio bajo condiciones controladas. Se seleccionaron aleatoriamente 64 plantas para los ensayos de estrés térmico.

3.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

3.2.1 Diagrama de flujo

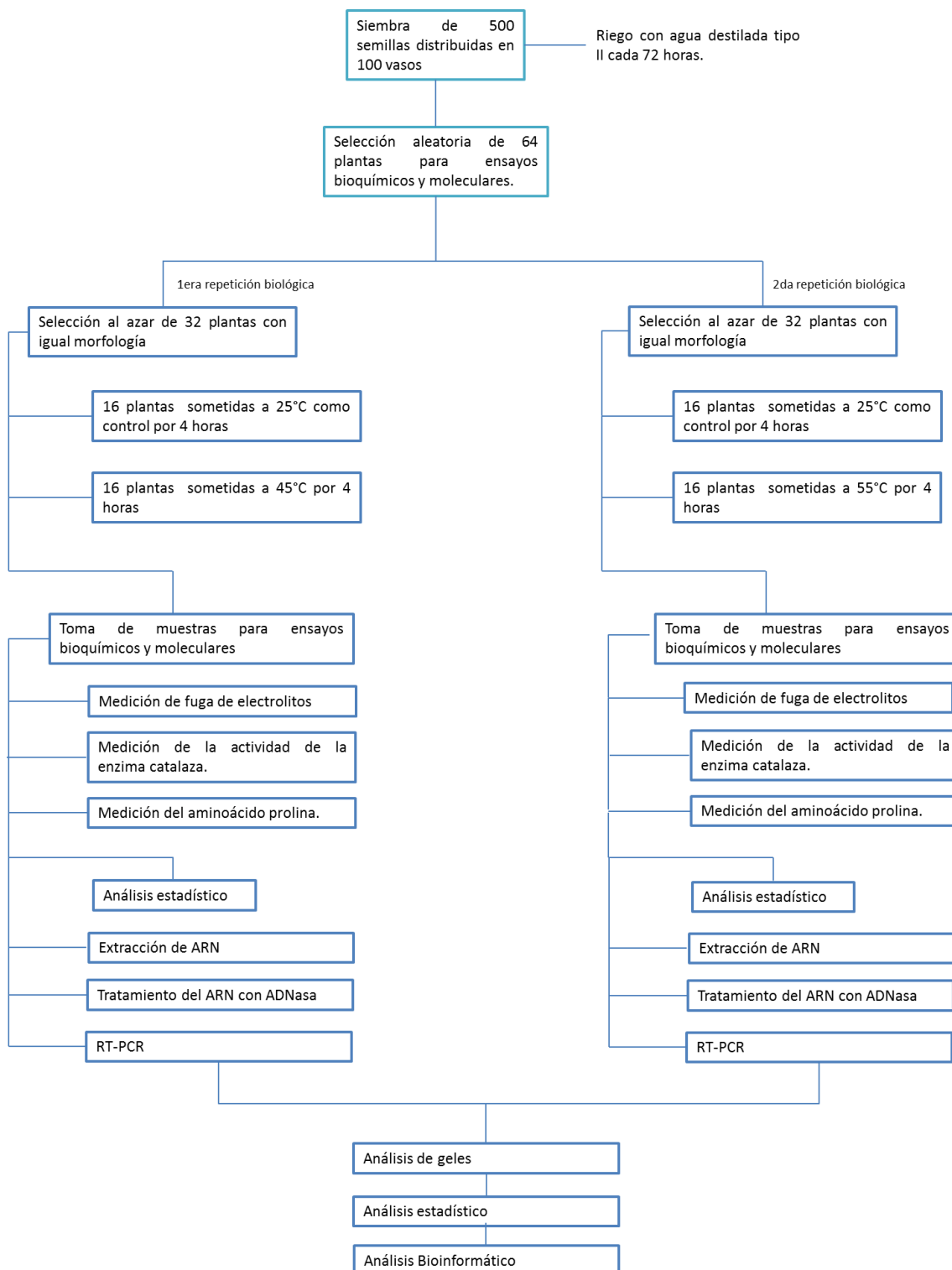


Figura 4. Diagrama de flujo según las actividades realizadas en el proceso experimental.

3.2.2 Ensayos de estrés térmico

Para el primer ensayo de estrés térmico directo, plántulas de aproximadamente 17 semanas con similar morfología (tamaño y número de hojas), teniendo en cuenta que cada plántula presente un mínimo de 4 hojas verdaderas, se agruparon en 2 grupos diferentes. El primer grupo constituyó 16 plántulas control a temperatura ambiente (25 °C) por 4 horas. El segundo grupo constituyó 16 plántulas colocadas en estufas de marca Memmert a una temperatura de 45 °C durante 4 horas. Los dos grupos se colocaron apartados de luz natural o artificial con la finalidad de evitar respuestas dependientes de luz.

Para la segunda repetición biológica, 8 semana después, 16 plántulas de aproximadamente 17 semanas con iguales características que las mencionadas en la primera repetición biológica, se sometieron a una temperatura de 55 °C. Las plantas fueron colocadas en la estufa durante 4 horas. Al igual que la primera repetición biológica 16 plántulas fueron utilizadas como control a temperatura ambiente (25 °C).

Transcurrido el tiempo de estrés, para ambas repeticiones, hojas de las plántulas fueron tomadas y separadas para los ensayos bioquímicos y moleculares. Las hojas tomadas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido (-196 °C). Finalmente las muestras se almacenaron a -80 °C en el ultracongelador hasta su uso en los ensayos bioquímicos y moleculares.

3.2.3 Ensayos bioquímicos

3.2.3.1 Análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos

El análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos se realizó inmediatamente después de los ensayos térmicos. Con un perforador de un solo hueco (6 mm), previamente desinfectado, se procedió a realizar 4 cortes en forma de disco en las hojas de cada planta de la primera y segunda repetición, 32 plantas en total por cada repetición. Los discos se lavaron con agua destilada durante 5 minutos. A continuación, se colocaron en vasos de precipitación de 25 ml con

20 ml de agua destilada. La conductividad (uS/cm) generada por los electrolitos liberados de cada planta se midió con el potenciómetro (Fisher Scientific accument XL600). Se realizaron 2 mediciones con un tiempo intermedio de 2 horas. La medición del punto final (3^{er} medición) se realizó 24 horas después cuando todos los discos de las plantas fueron autoclavados. El porcentaje de fuga de electrolitos se evaluó a través de la siguiente fórmula:

Ecuación 1. Fórmula para calcular el porcentaje de fuga de electrolitos. C_1 es el valor inicial y C_2 el valor final, después de la muerte de las hojas.

Tomado de (Bajji, 2002).

$$\% \text{ de fuga de electrolitos} = \frac{C_1}{C_2} * 100$$

3.2.3.2 Análisis de actividad de la enzima catalasa

El método de la actividad de la enzima catalasa se basó en el protocolo descrito por Aebi (1984), para lo cual fue necesario realizar soluciones de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 (soluciones stock) y una disolución de H_2O_2 al 30 % (para formar la disolución de trabajo). A continuación se tomó una hoja de cada planta de las repeticiones y se pulverizó con nitrógeno líquido en un mortero. Se pesaron 60 mg de polvo de hoja en una balanza analítica de marca OHAUS modelo PA214 dentro de un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml. Posterior a esto a cada muestra se adicionaron 100 μl de PBS 1X y se homogenizaron con pistilos estériles. Las muestras se centrifugaron en frío (4 °C) por 30 min a 14000 rpm. En un tubo de micro centrífuga nuevo de 0,7 ml se colocaron 50 % de sobrenadante con 50 % de la solución de trabajo. Finalmente se midió la absorbancia a 240 nm en una cubeta de cuarzo de 2 ml armada de la siguiente manera: 990 μl de solución de trabajo más 500 μl de H_2O_2 al 30 % más 10 μl de la dilución del sobrenadante con la solución de trabajo (50 %-50 %). Las medidas fueron tomadas a los 10 y 70 segundos después de empezar la reacción. Como blanco se utilizó 1,5 ml de solución de trabajo.

La actividad enzimática para cada una de las plantas se calculó usando la siguiente fórmula (Ecuación 2):

Ecuación 2. Fórmula para calcular actividad enzimática de la enzima catalasa. $t(10s)$ y $t(70s)$ representan las medidas de las absorbancias obtenidas a 240nm.

Tomado de (Aebi, 1984).

$$\text{Actividad enzimática (U)} = \frac{t(10) - t(70)}{0,01}$$

3.2.3.3 Análisis del contenido de prolina

El ensayo del contenido de prolina se basó en el método de (Bates, Waldren, & Teare, 1973). Para esto fue necesario realizar una dilución de ácido sulfosalcílico al 3 % y una solución de ácido ninhidrínico formulada de la siguiente manera: 1,25 g de ninhidrina en 30 ml de ácido acético glacial y 20 ml de H_3PO_4 6M. Las soluciones se almacenaron a 4 °C por un tiempo no mayor a una semana.

3.2.3.3.1 Curva estándar de prolina

Para realizar la curva estándar de prolina se pesaron 2, 5, 15, 25, 35 y 45 mg de L-prolina en una balanza analítica OHAUS modelo PA214 dentro de tubos de micro centrifuga de 1,5 ml y se disolvieron en 1 ml de agua destilada. Se realizó una dilución 1/10 para obtener concentraciones de $\mu\text{g/ml}$. En tubos de micro centrífuga de 1,5 ml se añadió: 100 μl de ácido sulfosalicílico, 200 μl de ácido acético glacial, 200 μl de ácido ninhidrínico y 200 μl de cada solución preparada con L-prolina. Los tubos se incubaron a 96 °C por 60 minutos, transcurrido el tiempo se detuvo con shock térmico frío. Se añadió 1 ml de tolueno al tubo de reacción y se realizó vortex por 20 segundos. Se dejaron reposar por 5 minutos para que las fases puedan separarse. Finalmente se tomó la fase orgánica de cada disolución y se midió a 520 nm en celdas desechables. Como blanco se utilizó 1 ml de tolueno.

3.2.3.3.2 Contenido de prolina para muestras

Se tomó una hoja de cada planta de las repeticiones y se molió con nitrógeno líquido. Se pesaron ~80 mg de polvo de hoja en una balanza analítica OHAUS modelo PA214 dentro de un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml. Se añadió 5 ul/mg de hoja de ácido sulfosalicílico al 3 % y se homogenizó con pistilo estéril para cada planta. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 14000 rpm por 15 minutos. En un tubo nuevo de 1,5 ml se añadió: 100 ul de ácido sulfosalicílico, 200 ul de ácido acético glacial, 200 ul de ácido ninhidrínico y 200 ul de sobrenadante por cada planta. A partir de esto, se procedió de igual forma que la mencionada en la curva estándar de prolina. Las muestras se midieron a 520 nm, utilizando tolueno como blanco.

3.2.4 Ensayos moleculares

3.2.4.1 Extracción de ARN de hojas de plántulas de *V. pubescens*

La extracción de ARN se realizó a 4 plantas de cada grupo de las repeticiones. El método se realizó según el protocolo descrito por (Chomczynski, 1987) con modificaciones. Las hojas de las plantas se molieron con nitrógeno líquido y se pesaron ~ 150 mg de polvo de hoja en una balanza analítica OHAUS modelo PA214 dentro de un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Posterior a esto se añadieron 750ul del reactivo TRIzol™ (Invitrogen™), se agitó por 30 segundos en vortex y se centrifugaron por 15 minutos a 15000 rpm para remover el material extra celular. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 ml y se añadieron 150 ul de cloroformo. Se agitó vigorosamente con la mano y las muestras se centrifugaron en frío (4 °C) por 15 minutos a 15000 rpm. La fase acuosa de cada muestra se transfirió a un tubo nuevo y se añadió 375 ul de isopropanol frío para precipitar el ARN. El tubo se agito suavemente por inmersión 3 veces. Las muestras fueron centrifugadas en frío (4 °C) por 15 minutos a 15000 rpm para separar el pellet.

Para el lavado de ARN se removió el sobrenadante de los tubos y se añadió 1 ml de etanol frío al 96 %. Se agitó por vortex una vez y se centrifugó en frío (4

°C) a 15000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se secó durante 10 minutos en cámara de flujo laminar NuAire-AireGard™. Finalmente el pellet de cada muestra se disolvió en 40 ul de agua libre de ARNasa y se almacenó en el ultra congelador a -80 °C hasta su uso.

3.2.4.2 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN se realizó a través del equipo Nanodrop™ (Invitrogen™). Se utilizó como blanco 1 ul de agua libre de ARNasa y 1 ul de muestra de cada planta.

3.2.4.3 Tratamiento con ADNasa

Cada una de las muestras fueron tratadas con el kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen™), según las instrucciones del fabricante.

3.2.4.4 RT-PCR

Los oligonucleótidos de los genes que codifica para Hsp70 y 18S utilizados para la RT PCR que se indican en la tabla 1 fueron diseñados a través de los software NCBI/Primer-Blast y OligoAnalyzer 3.1 disponibles en línea, a partir de la secuencia de *Carica Papaya* (Scontig1398 Hsp70) (Ming, 2008), tomada de la base de datos Phytozome (Goodstein, 2012). El gen *Vp18S* fue utilizado como control.

Tabla 1.

Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR en tiempo final

Genes	Cebadores	Oligonucleótidos	Tm (°C)	Tamaño (pb)
<i>HSP70</i>	<i>Forward</i>	ACTTGGTCTGGAAACCGCTGGC	62,3	~253
	<i>Reverse</i>	ACCGTTGGCAATGTCTGAAGCAG	61,8	
<i>18S</i>	<i>Forward</i>	ATGATAACTCGACGGATCGC	54,5	~180
	<i>Reverse</i>	CTTGGATGTGGTAGCCGTTT	55,3	

La RT-PCR para el gen que codifica para Hsp70 y 18S se armó con el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR Platinum® Taq HiFi (Invitrogen™), según las instrucciones del fabricante.

Para el gen que codifica para Hsp70 se armó un total de 13 reacciones incluyendo un control negativo con un volumen final de 25 ul por reacción. Para el gen 18S se armó un total de 4 reacciones incluyendo un control negativo con un volumen final de 25 ul por reacción. Cada reacción contenía 2,2 ul de ARN con tratamiento de ADNasa equivalente a una concentración de 200 ng.

Las condiciones para la RT-PCR se realizaron de la siguiente manera:

Tabla 2.

Condiciones utilizadas para la RT-PCR

Síntesis ADNc	Pre-denaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
	1 ciclo		35 ciclos		1 ciclo
55°C	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
20 minutos	2 minutos	15 segundos	30 segundos	1 minuto	5 minutos

3.2.4.5 Gel de electroforesis y cuantificación relativa de la expresión de *Hsp70*

El gel de electroforesis al 2 % con SYBR® Safe se realizó diluyendo 1,4 g de agarosa (Ultra pure agarose, Invitrogen™) en 70 ml de TBE 1X. Los productos de PCR se corrieron por 30 min a 100 voltios en la cámara de electroforesis (Bio-Rad). El gel de agarosa se reveló a través del equipo ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad). Finalmente, la expresión relativa del gen que codifica para Hsp70 fue cuantificada utilizando el software Image Lab™ 5.2.1 (Bio-Rad) por comparación de la intensidad de la banda con la intensidad de la banda del gen *VP18S* como referencia.

3.2.4.6 Secuenciación de *HSP70*

El fragmento perteneciente a *HSP70* de aproximadamente 253 pb se secuenció en los laboratorios de la Universidad de las Américas Quito, Ecuador, a través de una secuenciación de segunda generación por el método de Sanger.

3.2.5 Análisis bioinformático

3.2.5.1 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Para el alineamiento de secuencias, se utilizó la secuencia del gen de *HSP70* de *Arabidopsis Thaliana* (AT5G02500), a partir de la cual se realizó un txBlast con diferentes especies de plantas. Finalmente se obtuvo un total de 9 secuencias (Tabla 3) incluida la secuencia outgroup perteneciente al gen que codifica para la proteína ribosomal L5 de *A. thaliana* (At3g25520). El árbol filogenético se diseñó en el programa Mega 7 a partir de las secuencias descritas en la tabla 3 para de esta forma determinar su filogenia con las demás especies.

Tabla 3.

Secuencias utilizadas para el alineamiento y creación del árbol filogenético

Nombres:

>Carica_papaya_HSP70
 >KU065119.1_Carica_papaya_variedad_Maradol_HSP70
 >NM_001315590.1_Brassica_napus_HSP70
 >NM_120328.5_Arabidopsis_thaliana_HSP70
 >AB689673.1_Nicotiana_tabacum_HSP70
 >XM_002263563.3_Vitis_vinifera_HSP70
 >XM_006378652.2_Populus_trichocarpa_HSP70
 >At3g25520

Tomado de: (Ming, 2008)

3.2.5.2 Modelamiento a proteína y creación de Weblogo

A partir de la secuencia parcial de Hsp70, traducida a proteína, se realizó un modelamiento del polipéptido a través de la plataforma en línea SWISS-MODEL. De igual forma la representación gráfica o logotipo de las secuencias se crearon a partir de la plataforma en línea WebLogo (versión 2.8.2).

3.3 Evaluación Estadística de los resultados

Los datos que se obtuvieron de cada una de las pruebas bioquímicas y cuantificación relativa de la expresión del gen Hsp70, se analizaron a través de la plataforma R, con el paquete R commander. Para esto se empezó comprobando la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Dependiendo de la normalidad de los resultados, se procedió a realizar un ajuste de normalidad. A continuación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente se empleó la prueba de Tukey para verificar si existían diferencias entre las medias de los tratamientos. Es así que, para cada una de las pruebas bioquímicas y el análisis de expresión relativa de *Hsp70*, la hipótesis alternativa planteada fue que existían diferencias significativas en entre los tratamientos (45 °C y 55 °C), o que, por el contrario, las medias de los tratamientos eran iguales, sin existir diferencias significativas, considerada como la hipótesis nula.

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Material vegetal

4.1.1 Desinfección de las semillas de *V. pubescens*.

Las semillas se recolectaron a partir de 5 frutos maduros de *V. pubescens*. La figura 5A y 5B corresponden a los frutos desinfectados previamente con una solución de hipoclorito al 10 %. La figura 5C representa las semillas separadas del mucílago del fruto con los lavados de alcohol al 96 %. Esto se realizó con la finalidad de eliminar cualquier traza de microorganismo patógeno que pueda interferir con la siembra de las semillas en tierra. Finalmente en la figura 4D se puede observar las semillas ya desinfectadas y listas para sembrar.

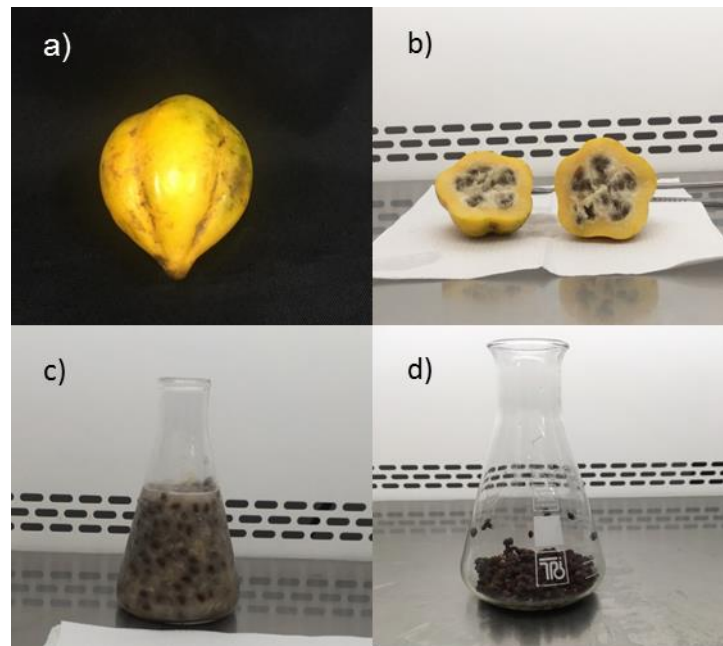


Figura 5. Desinfección de semillas de V. pubescens.

- a) Desinfección del fruto con solución de hipoclorito al 10 %.
- b) Separación de las semillas y del mucílago del fruto.
- c) Lavados con etanol al 96 %.
- d) Semillas desinfectadas y listas para sembrar.

4.1.2 Siembra de semillas de *V. pubescens*.

Se sembraron 250 semillas por cada repetición biológica repartidas en 50 vasos de polietileno de 8 oz cada uno, cada vaso contenía 5 semillas de *V. pubescens*. En la figura 6 se representa la germinación de *V. pubescens* según los días. Al cabo de aproximadamente 119 días desde la siembra, se obtuvo un modelo de plántula lista para ser sometida a ensayos de estrés térmico.

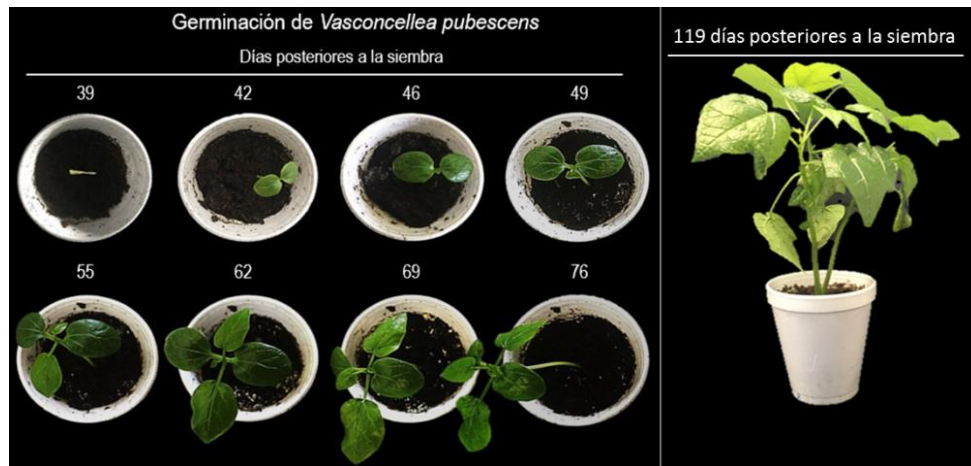


Figura 6. Germinación de *V. pubescens*. Aproximadamente 17 semanas.

4.2 Ensayos de estrés térmico

Para los ensayos de estrés térmico las plántulas de aproximadamente 17 semanas (119 días), se sometieron a dos temperaturas de estrés diferentes. Para la primera repetición biológica 16 plántulas de *V. pubescens* se sometieron a 25 °C como temperatura control y temperatura óptima de crecimiento para la planta, mientras que 16 plántulas se sometieron a 45 °C, temperatura que ha sido evaluada en ensayos previos de estrés térmico en los laboratorios de la Universidad de las Américas.

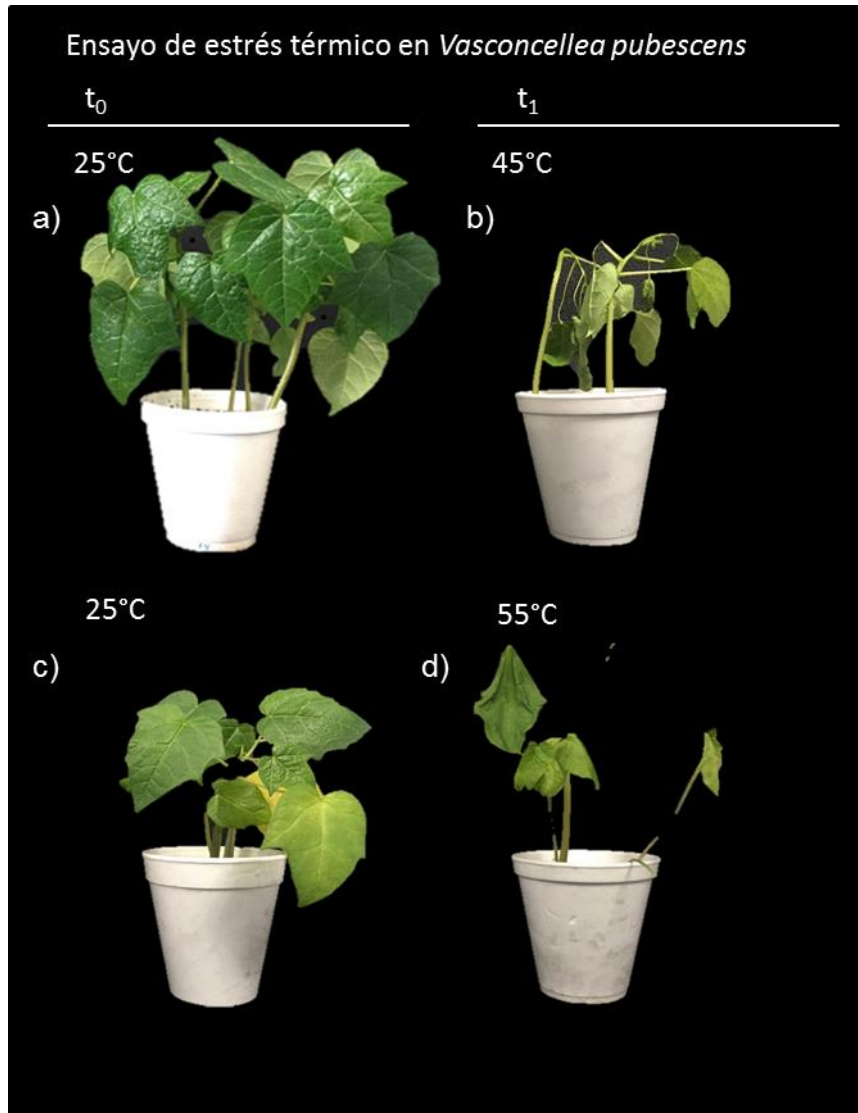


Figura 7. Ensayo de estrés térmico. Respuesta fenotípica debido al incremento de temperatura en plántulas de *V. pubescens*.

a) Plantas sometidas a 25 °C.

b) Plantas sometidas a 45 °C.

c) Plantas sometidas a 25 °C.

d) Plantas sometidas a 55 °C.

Como se observa en la figura 7B las plántulas al cabo de 4 horas de estrés térmico a 45 °C, mostraron notables alteraciones en su estado fenotípico. Se evidenció que los peciolo y hojas de la planta mostraban un decaimiento en

comparación con las plántulas sometidas a 25 °C. Sin embargo, al notar que los tallos de las plántulas continuaban erguidos y no existía una alteración notable en las hojas, como por ejemplo marchites o decaimiento total de la misma, se pensó que la planta era capaz de soportar mayores grados de temperatura. Por esta razón, y con el interés de determinar una temperatura de estrés verdadero en la planta, la segunda repetición biológica se realizó con 16 plántulas sometidas a 25 °C y 16 plántulas sometidas a 55 °C durante 4 horas. Como se observa en la figura 7D, al finalizar el tiempo de ensayo, se observó un mayor decaimiento y flacidez de los tallos y peciolo, de igual manera las hojas se mostraron totalmente débiles presentando un aspecto doblado siguiendo la nervadura central. También se observó que las mismas estaban marchitas y quebradizas ante el tacto. Debido a las características fenotípicas mostradas por la planta en ambos ensayos, se podría decir que de cierto modo la termotolerancia de *V. pubescens* persiste aún a temperaturas más extremas, ya que después de 4 horas a una temperatura de 55 °C la planta recién alcanza un verdadero estrés, al menos fenotípicamente. Estos datos, resultan interesantes, ya que *V. pubescens* es conocida comercialmente como papaya de montaña o papaya de altas tierras debido a que su crecimiento y desarrollo se produce a elevadas altitudes. Esta es una de las razones, por las que Scheldeman (2007), describe a los Andes del noreste de América del sur como el centro de diversidad de la especie *Vasconcellea*. Así mismo, se considera a la región Andina del norte de Ecuador como el lugar con el mejor clima para el desarrollo de *Vasconcellea*, teniendo en cuenta que el clima de esta región varía de 25 °C a -20 °C según la altitud. Es así que, Ecuador tiene la mayor riqueza de este tipo de planta. La mayoría de especies de *Vasconcellea* está confinada a la región norte andina por consiguiente estas especies prefieren climas fríos y con estacionalidad limitada, tal como es frecuente en los Andes ecuatoriales (Scheldeman et al., 2007). Por los resultados obtenidos se evidenció que fenotípicamente este tipo de planta, a pesar de crecer en climas fríos, propios de los Andes, puede resistir altas temperaturas (45 °C y 55 °C), mismas que según bibliografía deberían ser temperaturas extremas y causales de muerte para este tipo de planta.

Por otro lado, las plantas tienen una temperatura de crecimiento y desarrollo óptimo, que varía según la especie de planta. Sin embargo, cuando se sobrepasa la temperatura óptima, la planta comienza a someterse a un nivel creciente de estrés por calor hasta que alcanza un punto de muerte por calor. Las temperaturas que se consideran letales para plantas con flores pueden variar desde los 40 °C hasta los 65 °C (Binelli & Mascarenhas, 1990). El tiempo de muerte por calor largo o prolongado, es un indicativo de un alto nivel de termotolerancia, sin embargo, el tiempo de muerte por calor corto refleja un bajo nivel de termotolerancia. Por lo tanto, si bien es cierto que se evidenció, fenotípicamente, un nivel de estrés por calor en las plántulas de *V. pubescens*, es necesario mencionar que las mismas no murieron a pesar de estar 4 horas sometidas a temperaturas de estrés.

4.3 Análisis de ensayos bioquímicos

Los análisis bioquímicos, se realizaron con la finalidad de medir de forma cuantitativa el estrés generado en la planta, y se pueda corroborar que existe un estado de estrés debido al incremento de temperatura.

4.3.1 Análisis del porcentaje de fuga de electrolitos

La estabilidad e integridad de la membrana de las células de las hojas se evaluó a través de la fuga de electrolitos generada. Al analizar la normalidad de los datos a través de la plataforma R con el programa Rcomander y la prueba de Shapiro-Wilk, se comprobó que los mismos no eran normales ya que presentaron un valor $p = 1,896e-08$. Por lo tanto se procedió a realizar un ajuste de normalidad (1/x) obteniéndose un valor $p = 0,0864$. El test de análisis de varianza (ANOVA) que se indica en el anexo 1 señaló que si existieron diferencias significativas en el factor temperatura $p = 6,95e^{-10}$, con un nivel de confianza del 0,001 obteniéndose una diferencia altamente significativa entre las temperaturas evaluadas (25 °C, 45 °C y 55 °C). Adicionalmente, la prueba HSD por sus siglas en inglés (honestly-significant-difference) de Tukey indicó que existe diferencia entre las medias de las tres temperaturas utilizadas en este ensayo (Fig 8). En este tipo de prueba bioquímica se logró evidenciar que

a medida que aumenta la temperatura el porcentaje de pérdida de electrolitos generado por la planta es mayor, para 45 °C se obtuvo una media de 26,64 % y para 55 °C fue de 35,33 % en comparación con las plántulas control a 25 °C que tuvo una media del 15,97%.

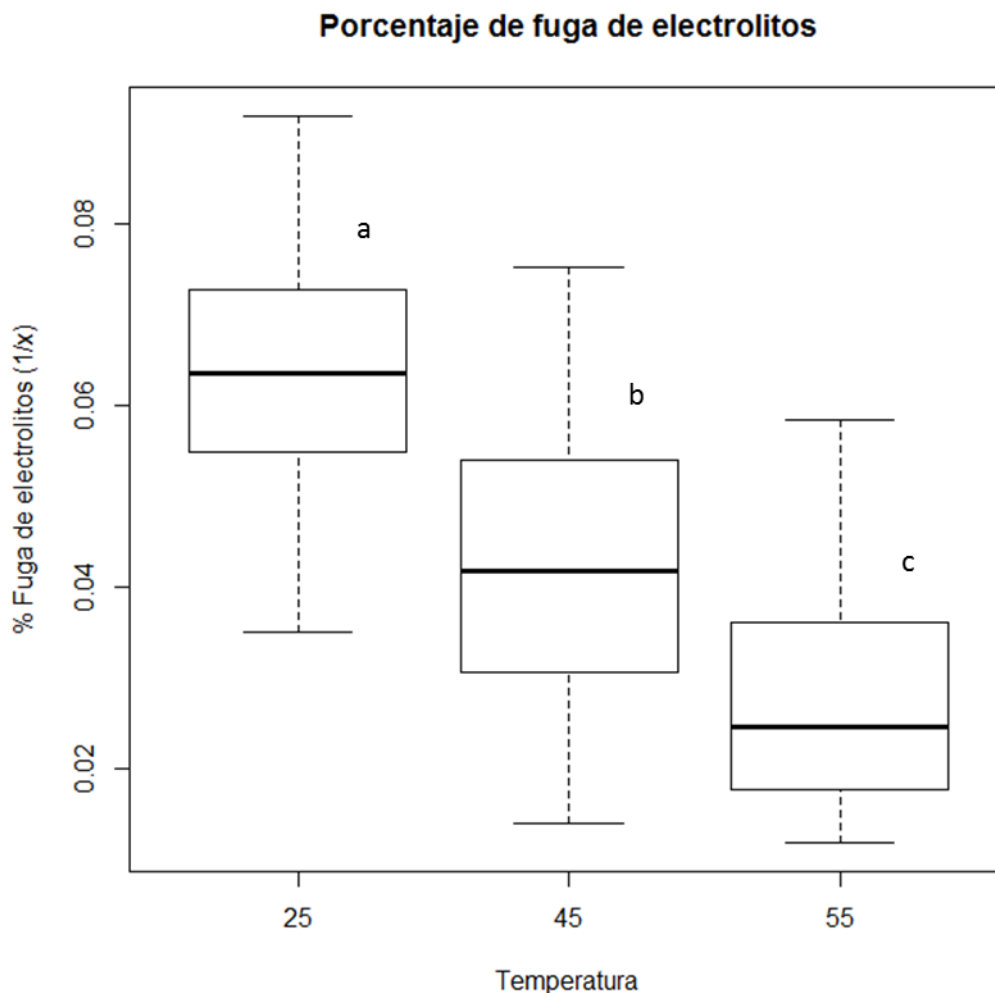


Figura 8. Porcentaje de fuga de electrolitos de *V. pubescens* en respuesta al incremento de temperatura (45 °C y 55 °C). El etiquetado de letras diferentes, representa la diferencia significativa obtenida entre las medias de los tratamientos según la prueba de Tukey.

La fuga de electrolitos es un indicador del daño causado en la membrana plasmática de las células después de la exposición ante cualquier tipo de estrés. Cuando las plantas se encuentran bajo estrés, la membrana plasmática se denatura o forma agregados dependiendo de la severidad del estrés estos

cambios incrementan la fuga de electrolitos de la membrana (Khair & Karim, 2015). En el presente ensayo se evidenció la pérdida de la estabilidad e integridad de la membrana debido al incremento del porcentaje de fuga de electrolitos conforme aumenta la temperatura de estrés. Este incremento, a su vez representa un atributo importante para la senescencia foliar inducida por calor (Wang, Juliani, Jespersen, & Huang, 2017). En un experimento realizado por Binelli (1990) en *Arabidopsis thaliana*, se observó que existía más del 50 % de pérdida de electrolitos en tan solo 15 minutos cuando las plantas (cultivadas *in vitro*), eran sometidas a una temperatura de 50°C. Por lo tanto concluyeron que *Arabidopsis* es una variedad altamente sensible al calor, y llega a la muerte al alcanzar esta temperatura. Otro estudio realizado por Wilson (2013), evaluó la pérdida de electrolitos de *Brassica juncea* ante estrés térmico de la siguiente forma: 45 °C por 4,5 horas en tres genotipos diferentes clasificados como: tolerantes, moderadamente tolerantes y susceptibles al calor. Encontró que aquellos genotipos susceptibles al calor presentaron el más alto porcentaje de pérdida de electrolitos (78,96 %), mientras que las los genotipos tolerantes y moderadamente tolerantes presentaron 52,48 % y 60,09 % respectivamente. Estos resultados guardan relación con los obtenidos en este estudio pues se evidencia que el incremento de la temperatura provoca daños en la membrana celular aumentado de esta forma la pérdida de electrolitos. Adicionalmente, al comparar estos resultados con los obtenidos en este ensayo, el mayor porcentaje de pérdida de electrolitos obtenido (35,33 %) se alcanzó cuando las plántulas se sometieron a 55 °C durante cuatro horas, por lo que se podría asumir que, a diferencia de *B. juncea*, *V. pubescens* presenta mayor termotolerancia que incluso los mismos genotipos tolerantes evaluados en el estudio de Wilson (2013).

Existen diferentes mecanismos que pueden alterar la estabilidad e integridad de la membrana que a su vez es controlada por distintos compuestos químicos, entre los principales se encuentran: los ácidos grasos o fosfolípidos, esteroides y proteínas (Tair & Zeiger, 2002). Cualquier cambio que ocurra en los constituyentes de la membrana en respuesta al estrés térmico, desempeña un papel crítico en la tolerancia al estrés de la planta (Wang, Juliani, Jespersen, &

Huang, 2017). Los ácidos grasos saturados e insaturados presentes en la membrana, así como su composición adecuada, es considerada crítica para que la célula pueda mantener la estabilidad de la membrana durante la adaptación de la planta ante condiciones de estrés (Wang, Juliani, Jespersen, & Huang, 2017). Adicionalmente, Wilson (2013) relacionó la peroxidación de lípidos, la cual se incrementa durante el estrés por calor, con la pérdida de la integridad de las membranas y por ende con la pérdida de electrolitos. Según Liu (2000), las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se acumulan durante el estrés por calor reaccionan con los lípidos insaturados de las membranas causando la peroxidación lipídica, esto a su vez lleva a la acumulación de malondialdehído (MDA), responsable del daño causado en las membranas de las células. Por lo tanto el daño oxidativo causado en los lípidos desestabiliza la integridad de la membrana, provocando la fuga de electrolitos (Liu & Huang, 2000).

Adicionalmente, Wang (2017), relaciona al aumento de ácidos grasos saturados y la reducción de ácidos grasos altamente insaturados con el estrés por calor que sufren las plantas. De esta forma, el aumento en el nivel de saturación de los ácidos grasos podría interferir con la fluidez de la membrana debido al aumento de temperatura (Wang, Juliani, Jespersen, & Huang, 2017).

Las proteínas de membrana están envueltas en diferentes procesos, en los que se incluyen señalización, transferencia de electrones y protección contra el estrés. Sin embargo, algunas de estas proteínas pueden verse afectadas cuando la planta se encuentra bajo estrés por calor causando que se degraden o se disocien de la membrana (Kosová, Vítámvás, Prášil, & Renaut, 2011). En el estudio realizado por Wang (2017), el contenido de las proteínas de membrana decreció bajo estrés por calor en plantas de *Festuca trachyphylla*. Lo que sugiere que la reducción de estas proteínas pueden afectar negativamente la estabilidad de la membrana celular en especial en plantas sensibles al calor.

Dong (2015), evaluó dos líneas puras (Chiifu & Kenshin) pertenecientes a *Brassica napa*. En sus resultados se evidencia que a partir de 2 horas de

exposición de las hojas a 45 °C, la línea pura Kenshin, tenía mayor termotolerancia, y al cabo de 4 horas presentó ~30 % de fuga de electrolitos en comparación con la línea Chiifu que presentó ~50 % después de 4 horas. Concluyeron que la medición de pérdida de electrolitos se considera como un buen indicador de termotolerancia en plantas, al igual que un marcador útil para medir la sensibilidad ante la temperatura en esta especie de planta (Dong et al., 2015).

Al obtener una mayor fuga de electrolitos conforme la temperatura de estrés fue aumentando, se corrobora que este tipo de prueba bioquímica es considerada como un método efectivo para medir termotolerancia también en plantas de *Vasconcellea*. Por otra parte, aunque, la fuga de electrolitos se incrementó conforme subía la temperatura, como respuesta al estrés por calor y sus repercusiones sobre la membrana celular, esta no sobrepasó el 50 %. Por lo tanto, se puede asumir que a pesar del daño causado en la membrana celular, existiría la posibilidad de que este tipo de planta pueda resistir mayores tiempos de estrés o temperaturas aún más altas. El estrés por calor causa la pérdida e integridad de la membrana celular, lo que a su vez conduce a la disfunción celular.

4.3.2 Análisis de la actividad de la enzima catalasa

El sistema antioxidante de las plantas es una línea de defensa para que las mismas puedan enfrentar el estrés abiótico, incluido el estrés por calor. El incremento de proteínas antioxidantes se correlaciona positivamente con la termotolerancia que poseen las distintas especies (Xu, Wang, Bonos, Meyer, & Huang, 2018). El ensayo de la actividad de la enzima catalasa se empleó con la finalidad de medir el daño oxidativo causado por el incremento de temperatura. Se comprobó que los datos obtenidos eran normales mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, con un valor $p=0,1254$. El test de análisis de varianza (ANOVA) que se indica en el anexo 3 señaló que no existieron diferencias altamente significativas en el factor temperatura $p=0,0366$ con un nivel de confianza del 0,001 (Anexo 2). La prueba HSD de Tukey, comprobó que las medias de la actividad de la enzima catalasa a la

temperatura de 25°C, 45°C y 55°C con sus valores 2.648, 2,705 y 1,766 respectivamente, eran estadísticamente iguales (Fig. 9). Con los resultados obtenidos, se logró analizar que la actividad de la enzima catalasa a 45°C presenta un comportamiento igual a la actividad de dicha enzima cuando las plántulas se encuentran a 25°C. De igual manera se observó también que la actividad de la enzima catalasa a 55°C bajó con respecto a las demás temperaturas de ensayo, siendo así, que, a esta temperatura se evidencia un cambio en la respuesta de la planta. Sin embargo, según la prueba de Tukey, la media de la actividad de la enzima a 55°C es estadísticamente igual a las de demás temperaturas, por lo que se asume, que, por lo menos con este tipo de enzima antioxidante, el comportamiento de la planta no se ve afectado por el incremento de temperatura y se mantiene relativamente igual que a las temperaturas de 25°C y 45°C (Fig 9), aceptándose la hipótesis nula.

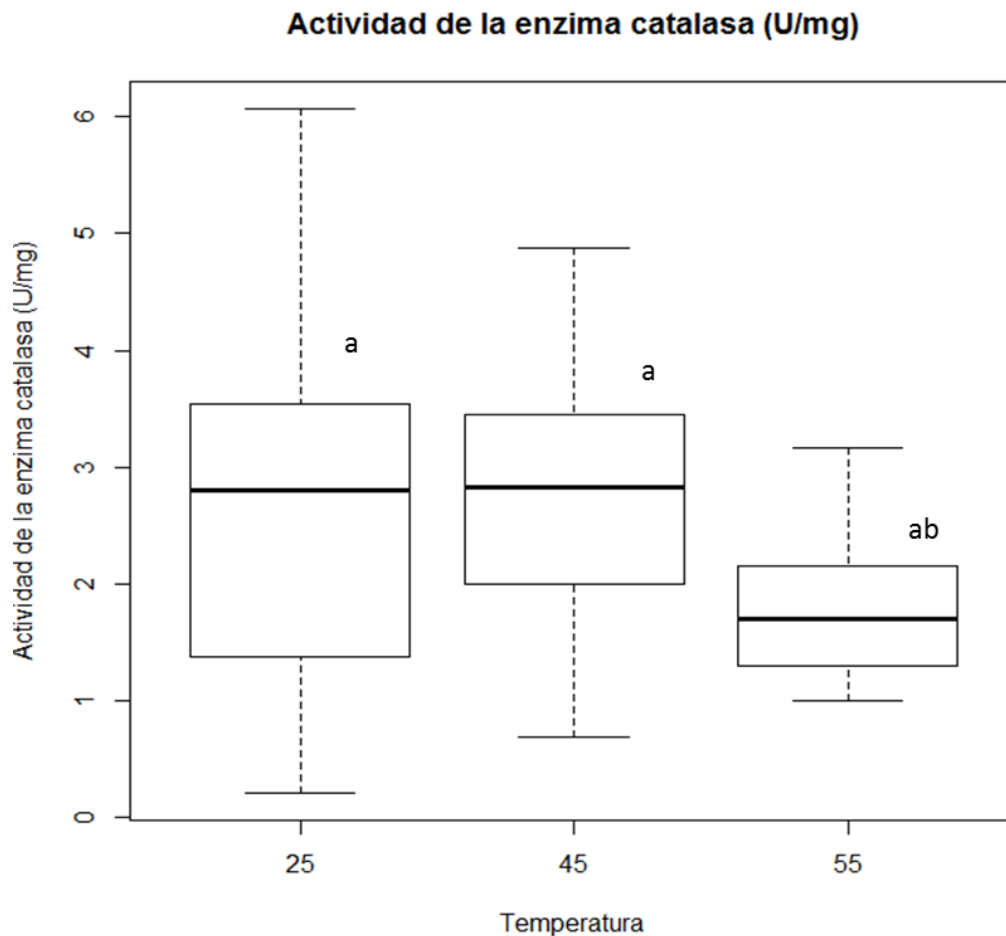


Figura 9. Actividad de la enzima catalasa (U/mg) de *V. pubescens* en respuesta al incremento de temperatura (45°C y 55°C). Las letras iguales representan que los valores obtenidos no son estadísticamente significantes con respecto a la temperatura control (25°C), según la prueba de Tukey.

La acumulación de (ROS), incluyendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), han sido implicados con la exposición que tienen las plantas ante el estrés abiótico y biótico (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). La catalasa es una enzima antioxidante, localizada principalmente en los peroxisomas, está encargada de la descomposición del H_2O_2 en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). Los peroxisomas contienen diversas enzimas entre ellas, flavin oxidasas que se caracterizan por formar H_2O_2 a partir de la oxidación de diferentes sustratos utilizando oxígeno molecular (Corpas, Barroso, & Del Río, 2001) (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). La enzima sulfito oxidasa (SO) se

encarga de catalizar la conversión de sulfito en sulfato, generando H_2O_2 (Hänsch et al., 2006). Se ha reportado que bajas concentraciones de sulfito inhiben la actividad de la enzima catalasa, por lo que Gupta (2015) propone que este compuesto podría ser un medio para regular ambas enzimas. La enzima ascorbato peroxidasa también se encarga de la reducción del H_2O_2 para formar H_2O debido a la oxidación del ascorbato mediante el ciclo ascorbato-glutatión. Los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas de las plantas utilizan este mecanismo para combatir el H_2O_2 , el cual deriva de las cadenas de transporte de electrones (Millar et al., 2001). Cuando aumenta estrés abiótico, la planta produce una variedad de químicos redox: tocoferol, carotenos, ubiquinonas y plastoquinonas, mismas que se encuentran diferencialmente localizadas en los cloroplastos, mitocondrias y en las membranas peroxisomales con la finalidad de prevenir la oxidación de las membranas celulares (Millar et al., 2001). Por lo tanto, la falta de incremento en la actividad de la enzima catalasa puede explicarse debido a que existe más de una enzima antioxidante y diferentes mecanismos para combatir el H_2O_2 localizados en varios compartimientos de la célula, incluidos los peroxisomas, principal orgánulo en donde se localiza la enzima catalasa.

También pudo deberse a que el H_2O_2 se haya difundido hacia el citosol (Sarwat, Ahmad, & Abdin, 2013). El H_2O_2 es más permeable a través de las membranas que otras especies reactivas del oxígeno, además es tóxico, por esta razón cuando se encuentra en el citosol es secuestrado por distintos sistemas antioxidantes como enzimas peroxidases, el ciclo de ascorbato-glutatión o por el sistema tioredoxina peroxirredoxina (Gupta, Palma, & Corpas, 2015). Por otra parte, la enzima catalasa presenta menor afinidad por el sustrato (H_2O_2) que otras peroxidases ya que se requiere la entrada simultánea de dos moléculas de H_2O_2 en el sitio activo de la enzima (Willekens et al., 1997). Según un estudio realizado por Wang (2012) en donde sometieron a estrés térmico frutos de *Musa acuminata*, por inmersión en agua caliente (52 °C), la actividad de la enzima catalasa así como su expresión génica disminuyó en los tratamientos en comparación con los frutos control. Sin embargo, la expresión y actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa y glutatión

reductasa se potenciaron fuertemente en el tratamiento térmico. Por lo que concluyeron que la activación y sobreexpresión de las enzimas antioxidantes, pero no de todas, para combatir el estrés abiótico, está altamente regulado por cada especie de planta (Haibo Wang, Zhang, Xu, Huang, & Pang, 2012).

Estos resultados permiten asumir que las especies reactivas del oxígeno generadas por el estrés térmico en *V. pubescens* pueden estar siendo descompuestas por otras enzimas antioxidantes, cuya actividad y expresión podría resultar mayor en comparación con la enzima catalasa. Por otro lado Rivero (2004) que realizó un ensayo de estrés térmico (35 °C) a plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), donde propuso que la disminución de la actividad de la enzima catalasa y guaiacol peroxidasa en las plantas con tratamiento pudo deberse a la inactivación de estas enzimas debido a la alta temperatura. Las plantas de tomate cultivadas a 25°C, como controles, indicaron mayor actividad de las enzimas encargadas de eliminar el H₂O₂, por lo que confirman que el sistema antioxidante de la planta funciona correctamente a temperaturas óptimas, pues impiden la acumulación masiva de H₂O₂ (Rivero, Ruiz, & Romero, 2004). Sin embargo, los datos que se obtuvieron en este ensayo para *V. pubescens* indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las actividades, por lo que también se puede suponer que la planta intenta mantener el sistema de defensa antioxidante en condiciones óptimas, lo que a su vez representa una estabilidad frente al estrés térmico.

4.3.3 Análisis del contenido de prolina

El contenido de prolina presente en las hojas de plántulas de *V. pubescens* se evaluó a partir de la elaboración de una curva de calibración (Fig 10). Para esto se utilizó concentraciones de L-prolina desde 2 a 45 ug/ml obteniéndose un comportamiento lineal. El coeficiente de determinación (R^2), con un valor de 0,99 nos indicó una correlación positiva de los datos. Con la ecuación resultante de la curva de calibrado, los valores de absorbancia medidos a 520 nm, se transformaron a valores de concentración de prolina (mg/g de peso fresco). Las absorbancias que se obtuvieron para las 64 muestras de hojas de

plántulas estaban dentro del mismo intervalo que las absorbancias obtenidas para la curva de calibración.

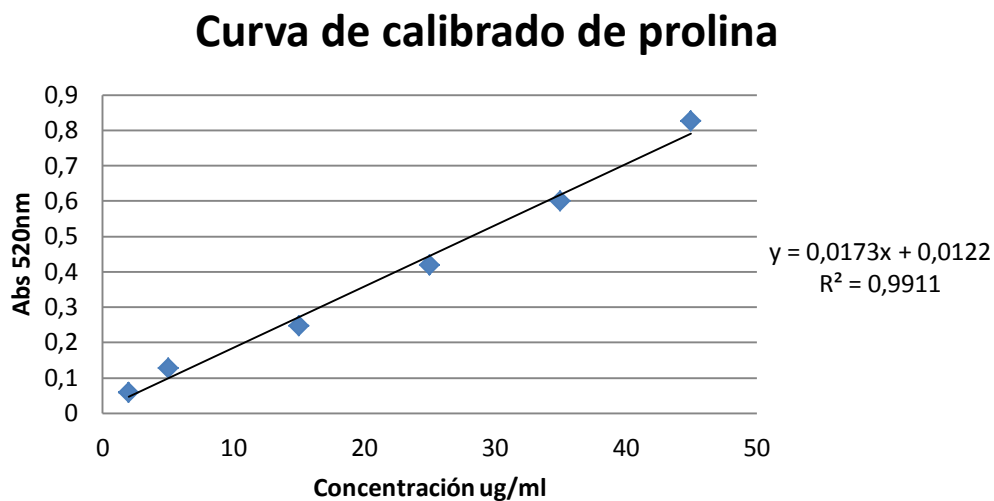


Figura 10: Curva de calibración de L-prolina con un rango de concentración de L-prolina de 2-45 ug/ml.

El aumento de temperatura en el medio, puede cambiar las condiciones óptimas para el crecimiento, desarrollo y producción del cultivo, y por ende afectar al campo de la agricultura (Harsh et al., 2016). La acumulación de prolina es considerada una estrategia para la protección y supervivencia de la planta bajo condiciones de estrés abiótico (Chen et al., 2007). Se comprobó mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk que los mismos no eran normales. Por lo tanto se procedió a realizar un ajuste de normalidad (1/x). El análisis de varianza (ANOVA), indicó que existen diferencias altamente significativas, $p = 2,18e^{-10}$, entre los tratamientos de temperatura (25 °C, 45 °C y 55 °C), con un valor de significancia de 0,001 (Anexo 5). De igual forma, el test de comparación de medias de Tukey, mostró que existen diferencias entre las medias de las tres temperaturas utilizadas en este ensayo (Fig 11). Las plantas sometidas a 45 °C y 55 °C, con valores de 0.6574 y 1.4046 (mg/g peso fresco) respectivamente, presentaron un mayor contenido de prolina libre en las hojas de las plántulas en comparación con las plantas control (25 °C) cuyo valor fue de 0,3769 mg/g peso fresco.

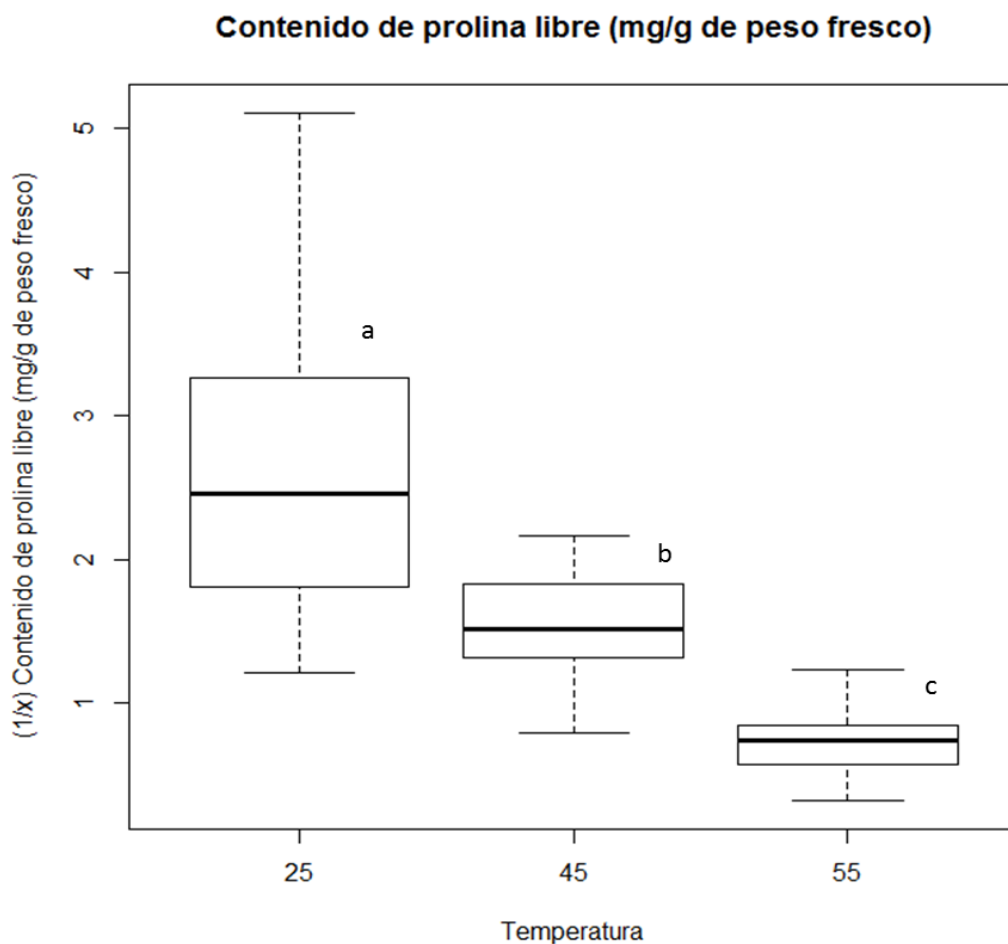


Figura 11. Contenido de prolina libre (mg/g de peso fresco) de *V. pubescens* en respuesta al incremento de temperatura (45 °C y 55 °C). El etiquetado de letras diferentes, representa la diferencia significativa obtenida entre las medias de los tratamientos según la prueba de Tukey.

Las plantas pueden mantener su crecimiento y desarrollo a pesar de las fluctuaciones ambientales ya que emplean distintos mecanismos metabólicos que permiten cambios dinámicos para prevalecer ante estas condiciones (Millar et al., 2001). El incremento de temperatura provoca la sobreproducción y acumulación de osmolitos que pueden ser orgánicos o inorgánicos (Rasheed, Wahid, Farooq, Hussain, & Basra, 2011). La prolina es un soluto compatible que actúa como un antioxidante no enzimático, chaperona de bajo peso molecular u osmo regulador cuando la planta se encuentra bajo estrés, para evitar la pérdida de agua (Gupta, Palma, & Corpas, 2015) (Gupta et al., 2013).

Este tipo de osmolito estabiliza y protege la estructura de las proteínas y es capaz de eliminar OH^+ (una especie reactiva del oxígeno), cuya acumulación ocasiona efectos negativos en la planta. La prolina presenta un carácter *zwitterion* o ion dipolar, que, bajo condiciones de estrés, se acumula en el citoplasma de las células sin interferir con la estructura celular o el metabolismo (Hameed, Goher, & Iqbal, 2012; Harsh et al., 2016). De igual forma, al actuar como una chaperona de bajo peso molecular está relacionada al mantenimiento de la integridad de la membrana (Hameed, Goher, & Iqbal, 2012). Esto se podría correlacionar con el aumento en el porcentaje de fuga de electrolitos (Fig. 9), ya que esto indica la pérdida de integridad y estabilidad de la membrana, por tanto, al acumularse la prolina, nos brinda una idea de que la misma puede estar actuando de forma positiva para mantener la estabilidad de la membrana de las células. Un estudio realizado por Hameed (2012), en 10 genotipos de trigo, encontró un aumento significativo (del 16,57 % hasta 46,76 %) en el contenido de prolina bajo condiciones de estrés térmico (42 °C) por 2 horas, Esta acumulación puede deberse a sus características como chaperona, y por lo tanto, representa una respuesta de la planta ante condiciones de estrés por calor (Hameed, Goher, & Iqbal, 2012). De igual manera Rasheed (2011) sugiere que la prolina al tener propiedades que ayudan a proteger la membrana de las células podría ser utilizada para mejorar la tolerancia al calor en la caña de azúcar.

La prolina juega un rol importante en la osmo protección de la planta, cuyas funciones se han descrito por conferir tolerancia ante diferentes tipos de estrés abiótico (Kavi Kishor et al., 2005). Un estudio realizado por Cvikrová (2011), en donde plantas wild-type y plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que sobre expresaban (P5CSF129A) un gen involucrado en la ruta de biosíntesis de prolina, fueron sometidas a estrés térmico (40 °C) por dos horas. Los resultados indicaron que en ambos tipos de plantas el potencial hídrico disminuyó debido al estrés térmico provocado. Sin embargo, las plantas wild-type presentaron una disminución más pronunciada con respecto a las transformadas, por lo que concluyeron que la sobre expresión del gen hizo que estas plantas presenten mayor tolerancia al estrés térmico. Este estudio

demuestra que mayores cantidades de prolina facilitan la activación de mecanismos de defensa (Cvikrová et al., 2012). La acumulación de prolina contribuye a mantener el contenido agua presente en las hojas, de esta forma, se minimiza el efecto negativo de la transpiración en plantas sometidas a altas temperaturas (Zou et al., 2016). Se ha sugerido que la prolina disminuye la perturbación termodinámica causada por la deshidratación en las proteínas debido a su capacidad de inducir la formación de enlaces de hidrógeno alrededor de las proteínas, en condiciones de estrés hídrico (Hakim et al., 2018). Por otra parte, la acumulación de prolina en ausencia de cualquier tipo de estrés, se puede explicar porque podría actuar como una molécula reguladora o de señal que es capaz de activar múltiples respuestas que forman parte del proceso de adaptación al ambiente (Cvikrová et al., 2012).

Zhu (2012), realizó un estudio en frutos de *Carica papaya* sometidos a 7 °C y 35 °C. En el ensayo evaluó el contenido de prolina y la expresión del gen P5CS (involucrado en la síntesis de este aminoácido) a través de la reducción del ácido glutámico en prolina. Los frutos sometidos a 35 °C presentaron mayor expresión del gen P5CS y un mayor contenido (µg/ml) que aquellos sometidos a una baja temperatura (7 °C), por lo que relaciona al alto contenido de prolina como un factor para otorgar termotolerancia a la planta. A pesar de que esta acumulación se ha asociado con plantas que han estado bajo un tipo de estrés abiótico, los mecanismos que regulan su biosíntesis no son claros. Por lo tanto, es importante dilucidar el papel que cumplen las vías de señalización relacionadas con el estrés en la regulación de la síntesis de prolina, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias para mejorar la tolerancia de las plantas ante cualquier tipo de estrés (Zhu, Li, Zou, Chen, & Lu, 2012). El contenido de prolina puede variar entre los órganos de la planta, el mismo que es generalmente mayor en órganos reproductivos que en tejidos vegetales. Estos resultados, sustentan los obtenidos en este ensayo, demostrando así, que 2 especies (*C. papaya* y *V. pubescens*) pertenecientes a la familia Caricaceae tienen el mismo comportamiento frente a altas temperaturas de estrés y que por lo tanto la acumulación de prolina puede interpretarse como una respuesta de *V. pubescens* para aumentar su termotolerancia.

4.4 Análisis de los ensayos moleculares

4.4.1 Análisis de la cuantificación relativa del gen que codifica para Hsp70 y 18S.

En el anexo 7 se indican los valores de concentración ($\eta\text{g}/\text{ul}$ de ARN) y la pureza evaluada con la proporción 260/280, misma que debe ser de 2.0 para aceptar como puro al ARN obtenido a partir de la extracción realizada a hojas de plántulas de *V. pubescens*.

Los datos obtenidos sobre la expresión relativa de *HSP70* ante diferentes temperaturas presentaron un valor $p=0,1647$, después de realizarse la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. El análisis de varianza (ANOVA), indicó que existen diferencias altamente significativas en el factor temperatura, $p=5,64e^{-10}$, con un nivel de confianza de 0,001, entre los tratamientos de temperatura utilizados (Anexo 8). El test de comparación de medias de Tukey indicó que existen diferencias entre las medias de la expresión relativa de Hsp70 ante las temperaturas evaluadas (25 °C, 45 °C, y 55 °C), siendo así que la expresión relativa de *HSP70* en *V. pubescens* a temperaturas de 45 °C y 55 °C, fueron 3,67 y 4,776 veces mayor, respectivamente, que la temperatura control (25 °C), cuya expresión fue de 1,278 (Fig 12). Por lo tanto, se comprobó que, la expresión relativa del gen *HSP70* en plántulas de *V. pubescens* incrementa significativamente con la exposición al calor. La expresión del gen 18S en todos los tratamientos fue de 1, debido a su rol como gen control.

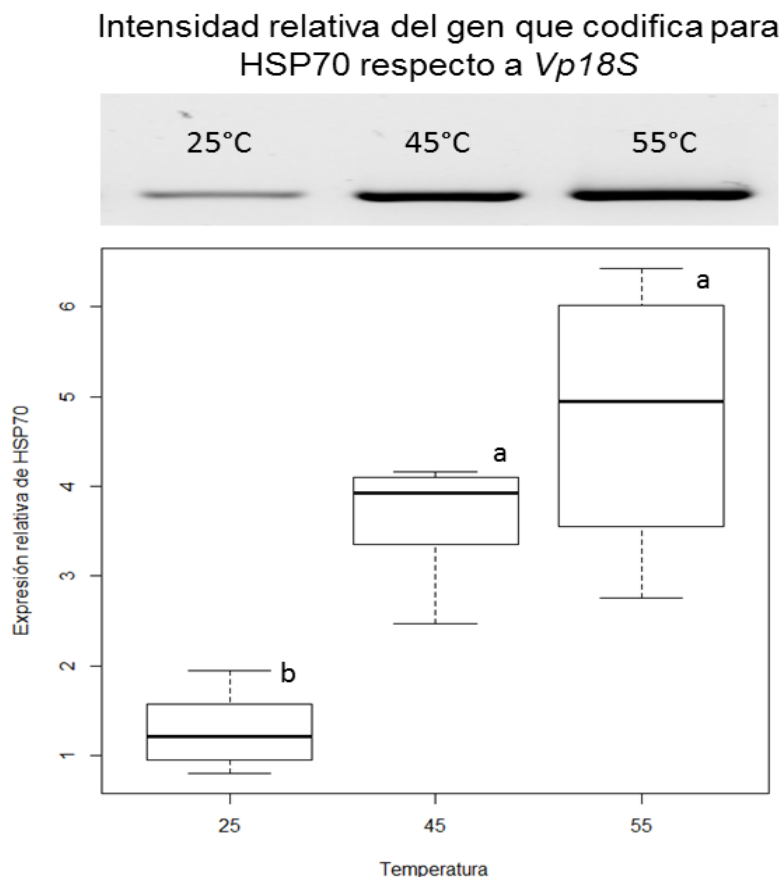


Figura 12. Expresión relativa del gen que codifica para Hsp70 con respecto a *Vp18S*. El etiquetado de letras diferentes, representa la diferencia significativa obtenida entre las medias de los tratamientos según la prueba de Tukey.

Las plantas al ser organismos sésiles están expuestas a factores de estrés cada vez más cambiantes (Al-Whaibi, 2011). A las altas temperaturas se las considera como uno de los mayores factores de estrés que afectan a las plantas de cultivo. El estrés por calor, provoca cambios en los niveles enzimáticos, actividad fotosintética, metabolismo de las proteínas y daño en la membrana celular (Al-Whaibi, 2011). La capacidad que presentan las plantas para sobrevivir a altas temperaturas internas del tejido, pueden presentarse tanto en condiciones áridas como en húmedas. Este tipo de tolerancia puede lograrse a través de varios mecanismos en los que se incluyen: cambios a nivel molecular, celular, bioquímicos y fisiológicos (Xu, Zhan, & Huang, 2011).

Hsp70, perteneciente al grupo de HSP, es una proteína chaperona que actúa uniéndose a las secuencias hidrofóbicas expuestas de las proteínas manteniendo la cadena peptídica desplegada hasta que la misma se pliega de forma correcta en su conformación tridimensional (Wang, Vinocur, Shoseyov, & Altman, 2004). Adicionalmente, es responsable de la translocación y procesamiento de proteínas asociadas con la síntesis y movilización de reservas, el estrés abiótico y defensa celular de la planta (Vale et al., 2014).

El estrés por calor está asociado a un mayor riesgo del plegamiento inadecuado de proteínas, así como a la desnaturalización de proteínas intracelulares y complejos de membrana (Kosová et al., 2011). Se ha reportado que cuando existe un aumento de temperatura en el ambiente, la expresión de genes asociados al estrés se incrementa, lo que a su vez se traduce como proteínas asociadas al estrés que se encargan de proteger a las proteínas nacientes de su desnaturalización y/o agregación, las cuales están involucradas en rutas metabólicas o en vías de defensa (Kumar & Rai, 2014). Entre las proteínas asociadas con el estrés, se encuentran HSP y las enzimas antioxidantes (Kumar & Rai, 2014; Kumar et al., 2016). Hsp70 actúa en la translocación de proteínas a través del retículo endoplasmático, ayuda al correcto plegamiento y maduración adecuada de las proteínas que entran en el orgánulo (Vale et al., 2014). Del mismo modo, existen estudios detallados, en donde asocian la sobre expresión de genes de esta proteína, con el mejoramiento en la tolerancia que presentan las plantas ante tensiones ambientales (Wang et al., 2014).

Hsp70 ha sido reportada como una proteína que se sobre expresa bajo distintas condiciones de estrés abiótico, como: calor, frío o exposición a metales, induciendo tolerancia frente a cada uno de ellos (Kumar et al., 2016). En un estudio realizado por Kumar (2016), plantas de trigo, *Triticum aestivum*, (termosensibles y termotolerantes) en diversas etapas de desarrollo, fueron sometidas a diferentes grados de temperaturas de estrés (30 °C, 35 °C, y 40 °C) para evaluar la expresión de *HSP70*. Durante un periodo de 2 horas y con temperaturas de 30 °C y 35 °C las plantas no mostraron una diferencia de

expresión significativa para *HSP70*. Sin embargo, a una temperatura de 40 °C, por el mismo periodo de tiempo, se observó que la variedad termotolerante presentó una expresión ~2,3 veces mayor al control. La expresión relativa de *HSP70* resultó ser mayor en la variedad termotolerante del trigo para todas las etapas de desarrollo que fueron probadas. De igual forma, el ensayo de inmunoblot demostró que existe una mayor cantidad de proteína Hsp70 en la variedad termotolerante en comparación con la variedad termosensible. Finalmente, sugieren que la acumulación y sobre expresión de *HSP70*, se debe a su rol como proteína chaperona, debido a que protege a las proteínas nacientes y ayuda a su plegamiento (Kumar et al., 2016). En la misma investigación realizada, se observó un aumento del osmolito prolina, en la variedad termotolerante.

Estos resultados sustentan los obtenidos en este ensayo lo que permite asumir que Hsp70 cumple su función como proteína chaperona en *V. pubescens*, y que por lo tanto, al sobre expresarse frente altas temperaturas, esta planta presenta cierto grado de tolerancia al estrés por calor. Esta característica, hace que se vuelva una especie de interés para futuras investigaciones, sobre todo porque se demuestra que la termotolerancia aún se observa en temperaturas altas (55 °C). Por otra parte, el incremento de prolina en la variedad tolerante, permite sustentar los resultados obtenidos, confirmando una vez más, que *V. pubescens* responde de forma similar a una variedad ya establecida como tolerante al estrés por calor.

Adicionalmente, en un estudio de estrés térmico (35 a 45 °C) realizado en dos tipos de césped (*Agrotis scabra* y *Agrotis stolonifera*) por distintos periodos y después de realizar un ensayo de inmunoblot, se encontró que existe mayor cantidad de Hsp70. La expresión continuó en aumento con periodos más largos de tiempo (24 a 28 h). Lo que indica que existe una correlación entre la inducción temprana de Hsp70 y el mantenimiento del tejido vegetal bajo temperaturas elevadas y por tanto una mejor tolerancia al calor (Xu, Zhan, & Huang, 2011). Estos resultados, confirman la relación que posee Hsp70 y la termotolerancia. En *V. pubescens*, la termotolerancia está involucrada con la

sobre expresión de esta proteína bajo condiciones de alta temperatura. Por otra parte, según Sabehat (1996), la termotolerancia que presentan las plantas al sobre expresar HSP, ha sido atribuido parcialmente a la asociación de estas proteínas con las membranas celulares. De esta forma, y debido al rol que cumplen las HSP como proteínas chaperonas, es posible que se asocien con las proteínas de membranas, como resultado de los cambios inducidos debido al estrés por calor para estabilizar su estructura y función durante y después del ensayo térmico (Sabehat, Weiss, & Lurie, 1996). Por lo tanto, se puede relacionar los resultados obtenidos en la prueba de fuga de electrolitos con la sobre expresión de Hsp70 obtenida en este experimento. Wang (2014) involucra a Hsp70 como una proteína que ayuda en la reparación del ciclo del fotosistema II en plantas ya que podría formar un complejo con las proteínas D1, D2 y CP47.

4.4.2 Análisis del alineamiento de secuencias y filogenia

El análisis filogenético realizado con las secuencias nucleotídicas que se observan en la figura 13 dio como resultado 2 clados y el *outgroup*. El primer clado está conformado por todas las especies mencionadas en la tabla 3 y está dividido a su vez en dos subclados. El primer subclado está formado por *V. pubescens*, *C. papaya*, *P. trichocarpa*, *C. papaya cv Maradol* y *V. vinífera*. Mientras que el segundo subclado está formado por *B. napus* y *A. thaliana*. El segundo clado lo conforma *N. tabacum*.

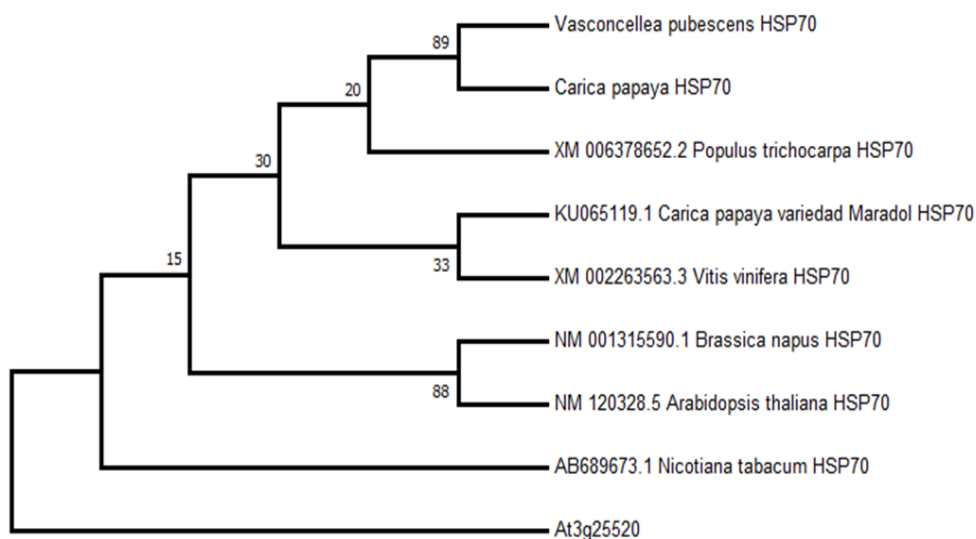


Figura 13. Árbol filogenético. Secuencia de Hsp70 de *V. pubescens* con secuencias Hsp70 reportadas para 7 especies diferentes de plantas. Outgroup: Atg25520.

Como se observa en el árbol *V. pubescens* tiene relación con *C. papaya*, esto a su vez concuerda con el porcentaje de similitud obtenido en alineamiento de secuencias (Fig 14), cuyo valor fue de 94,86 %. A pesar de que *Vasconcellea* y *Carica* pertenecen a la misma familia Caricaceae, estudios como el de Aradhya (1999), sugirieron que las especies de *Vasconcellea* se desarrollaron principalmente en América del Sur, debido a la gran diversidad que existe, y que la especie salvaje de *C. papaya*, parece tener una distribución que es enteramente centroamericana. En el análisis filogenético realizado señala que *C. papaya* forma un clado separado del resto de las especies de *Vasconcellea*, concluyendo que la fuerte divergencia de estos géneros podría deberse a que la evolución del género *Carica* no sea estrictamente monofilética. Resultados parecidos fueron reportados por Badillo (1971, 1993) y Costa (2011). Adicionalmente, Aradhya (1999), sugiere que por la falta de parientes sudamericanos estrechamente relacionados, la llegada de *C. papaya* a América del Norte, podría deberse a un ancestro en común que pudo haberse dispersado a través de islas entre continentes, y de esta forma, continuó su evolución de forma aislada al cortarse la ruta de migración. De ser así, el

movimiento de estas plantas entre América del Norte y del Sur fue hace más de 60 millones de años (Aradhya & Manshardt, 1999). Sin embargo, Hsp70 es una de las proteínas más conservadas en la evolución (Daugaard, Rohde, & Jäättelä, 2007). Esto explicaría que, pesar de la diferencia evolutiva entre *C. papaya* y *V. pubescens*, la secuencia nucleotídica comparta un 94,86 % de similitud. Por otra parte el menor porcentaje de similitud obtenido (79,43 %) resultó ser con la especie *C. papaya* cv. *Maradol*. A pesar de que *Vasconcellea* y *Carica* pertenecen a la familia Caricaceae, *Carica* comprende solo una especie, pero presenta distintos tipos de variedades, entre la que se encuentra *Maradol* obtenida a partir del germoplasma recolectado en la región central y oriental de Cuba. La variedad se obtiene en el año 1959, y el nombre *Maradol* se otorga en los años 1962-1963 (Manzano, 2008). Al ser una variedad relativamente nueva ya que el género *Vasconcellea* y *Carica* comparten más de 60 millones de años, se podría explicar el bajo porcentaje de similitud que se obtuvo el árbol filogenético. Por otra parte, *C. papaya* comparte un 82,86 % de similitud con *P. trichocarpa*, esto se puede comprobar en el árbol filogenético, en donde ambas especies se encuentran en el mismo clado.

Según un estudio realizado por Ming (2008), a pesar de que *C. papaya* esta evolutivamente más relacionado con *Arabidopsis*, comparte mayor número de genes con *P. trichocarpa*. Estos genes se relacionan con la expansión celular, lo que a su vez va de acuerdo con el alto de la planta, y la biosíntesis de lignina, lo que también es consistente con la evolución convergente del hábito arbóreo (Ming et al., 2008). Por lo tanto, se podría explicar que el lugar cercano que ocupa *P. trichocarpa* e inclusive *V. vinífera* en el árbol filogenético, se debe a que *V. pubescens*, al ser un árbol que alcanza hasta los 10m de altura y compartir la misma familia que *C. papaya*, guarda relación con lo explicado por Ming (2008). Esto a su vez explicaría también por qué *B. napus* y *A. thaliana* están juntas en un sub grupo separado de las demás especies de plantas ya que ambas comparten tamaños similares. De igual manera, *B. napus* y *A. thaliana* pertenecen a la misma familia brassicaceae, por lo tanto se relacionan evolutivamente. Por otra parte, que *N. tabacum* haya aparecido fuera del clado de *V. pubescens* como un clado diferente no resulta inesperado, debido a que

este tipo planta, perteneciente a la familia Solanaceae, no comparte características en común con la familia Caricaceae. Una de las características de *V. pubescens* es la presencia de látex, con alto contenido de enzimas proteasas (Gaete-Eastman et al., 2009), característica que no presentan las plantas solanáceas. Por otra parte, la familia solanácea se caracteriza por la presencia de alcaloides, que son bases nitrogenadas producidas por este tipo de plantas como metabolitos secundarios. A diferencia de *B. napus* que, a pesar de no compartir características fenotípicas o una evolución convergente, como lo hace *P. thichocarpa* o *V. vinífera* con *V. pubescens* o *C. papaya*, comparten el mismo género que *V. pubescens* (Brassicales), mientras que el orden de *N. tabacum* es solanales. Todas estas diferencias podrían explicar que *N. tabacum* aparezca como un clado diferente en el árbol filogenético.

```

V. pubescens_HSP70      1  TGATCC--AGAAACCA--CAATCCACCAAGAAG--ACAGGTCTTCTCAACCTACTCTG
Carica. papaya_HSP70   1  TGATCCCAAGAAATACCAACCATCCACCAAGAAGGAGCAGGTCTTCTCAACCTACTCAG
Carica. papaya_M_HSP70 1  TGATTCCCAGGAACAACAACCATCCACAAAGAAGGAGCAGGTCTTCTCCACTTACTCCG
Brassica. Napus_HSP70  1  TGATCGCAAGAAACAAGACCAATCCAAACCAAGAAGGAGCAAGTGTCTCCAGCTACTCTG
A. thaliana_HSP70     1  TGATCCCAAGGAACAACAACCATCCAAACCAAGAAGGAACAAGTCTTCTCCACTACTCAG
N. tabacum_HSP70      1  TGATCCCCCAACAACAACCTATCCAAACCAAGAAGGAACAAGTCTTCTCAACCTACTCCG
V. vinifera_HSP70     1  TGATTCCCAGGAACAACAACCATCCACAAAGAAGGAGCAAGTCTTCTCCACTTTCTCTG
P. trichocarpa_HSP70  1  TGATCCCAAGGAACAACAACCATCCACCAAGAAGGAGCAGGTCTTCTCAACTTACTCTG
At3g25520              1  TGA-----GGGAAACGTTGAGGCCACTGGAGAAG--ACTTTTCCGTGAGCCAACTGAT

V. pubescens_HSP70     55  ACAACCA--CTGGTGTGTGATCCAGGTTTATGAAGGTGAAAGAAACAAGAACCAGAGA
Carica. papaya_HSP70   61  ACAACCA--CTGGTGTGTGATCCAGGTTTATGAAGGTGAAAGAAACAAGAACCAGAGA
Carica. papaya_M_HSP70 61  ACAATCAG--CTGGACTGTGTGATTCAGGTTATCAGGGTGAGAGAAACAAGGACCCGGGA
Brassica. Napus_HSP70  61  ACAACCA--CCAGGTGTGTGATCCAGGTTCTCAGGGGAGAGAGCCAGAACCAGGA
A. thaliana_HSP70     61  ACAACCA--CCGGTGTGTGATCCAGGTTACAGAGGAGAGAGAGCCAGAACCAGGA
N. tabacum_HSP70      61  ACAACCA--CTGGTGTGTGATCCAGGTTATGAAGGTGAGAGAAACAAGGACCCGGGA
V. vinifera_HSP70     61  ACAACCA--CTGGTGTGTGATCCAGGTTATGAAGGTGAGAGAGAGAGGACCCAGGACAGAGA
P. trichocarpa_HSP70  61  ACAACCA--CCAGGTGTGCTCATCCAAGTTATGAAGGTGAGAGAGAGCAGGACCAAGGA
At3g25520              53  TCAAGGAGACCTTTCCGTGCTCTTCTGATGTT-TGACTTATCAGGACCAACAAGGAAA

V. pubescens_HSP70     113 CAACAACCTATGGGTAATTTGAGCTGTCCGGCATTCCACCAGCACCCAGAGGCTCTACC
Carica. papaya_HSP70   119 CAATAACCTATGGGTAATTTGAGCTGTCTGGCATTCCACCAGCACCCAGAGGCTCTACC
Carica. papaya_M_HSP70 119 CAACAACCTTGCCTGGGTAATTTGAACTATCAGGATCCCTCCTGCTCCAGGGGCTCTCC
Brassica. Napus_HSP70  119 CAACAACCTCCTCGGTAAGTTTGAGCTCTCTGGAAATCCCTCCGGCTCCACGTTGGTCTCC
A. thaliana_HSP70     119 CAACAACCTTCTTGGTAAATTTGAGCTCTCTGGAAATCCCTCCAGCTCCTCGTGGTCTCC
N. tabacum_HSP70      119 CAACAACCTTGCCTGGTAAATTTGAGCTCTCTGGCATTCCCTCCTGCTCCAGGGGCTCTCC
V. vinifera_HSP70     119 CAACAACCTTGCCTGGTAAATTTGAGCTCTCTGGCATTCCCTCCAGCTCCAGGGGCTCTCC
P. trichocarpa_HSP70  119 CAACAATTGCCTGGCAATTTGAGCTCTCTGGCATTCCCTCCAGCACCTAGGGGCTCTCC
At3g25520              112 CCGTG---TGTTCGGTGTCTATAAG-----GGTGTGTTGATGGTGGTCTTGAATATCC

V. pubescens_HSP70     173 TCA
Carica. papaya_HSP70   179 TCA
Carica. papaya_M_HSP70 179 ACA
Brassica. Napus_HSP70  179 CCA
A. thaliana_HSP70     179 CCA
N. tabacum_HSP70      179 TCA
V. vinifera_HSP70     179 TCA
P. trichocarpa_HSP70  179 TCA
At3g25520              163 TCA

```

Figura 14. Alineamiento nucleotídico entre la secuencia Hsp70 de *V. pubescens* obtenida y secuencias Hsp70 reportadas para 7 especies de plantas diferentes.

4.4.3 Análisis y modelamiento del polipéptido obtenido a partir de la secuencia de *VpHsp70*.

A partir de la secuencia parcial obtenida para Hsp70 de *V. pubescens* de aproximadamente 253 pb, se obtuvo un fragmento de la proteína de 59 aminoácidos, la cual fue modelada en el programa Swiss-Model (Fig 15A). La secuencia de aminoácidos deducida comparte un 75,86 % de identidad con la proteína heat shock cognate 71kDa (HSC71) de bovino reportada en Swiss-Model. Al realizar el análisis con la plataforma WebLogo (Fig 15B), se evidenció que la misma es altamente conservada entre la secuencias proteicas de los organismos descritos en la tabla 3.

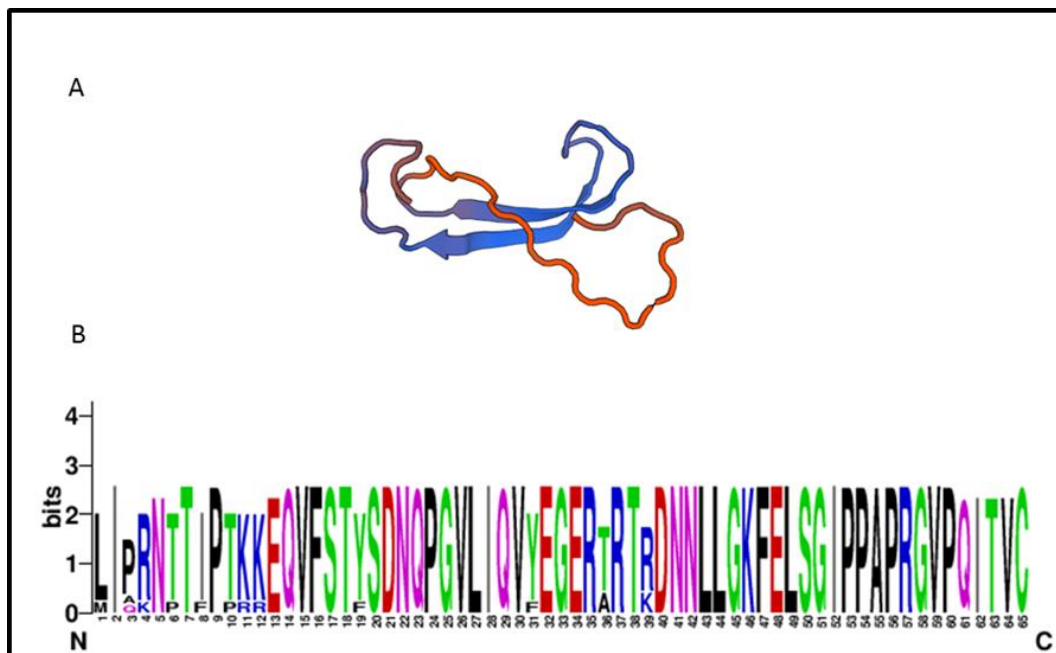


Figura 15. Modelamiento y WebLogo del polipéptido obtenido para Hsp70 de *V. pubescens*.

Las altas temperaturas son consideradas como un factor altamente destructivo para el ambiente y afectan numerosos procesos biológicos en todos los organismos. Cuando esto sucede, se induce a una HSR, para lograr mantener las actividades celulares y fisiológicas normales, para que esto suceda ocurre una inducción rápida y específica de Hsp (Calderwood & Asea, 2016). Hsp70, se considera la proteína más conservada en la evolución. Esta proteína está

presente desde las arqueas hasta las plantas y humanos. Inclusive, Hsp70 del reino procariota, comparte un 50 % de homología en su secuencia de aminoácidos con la secuencia de Hsp70 de células eucariotas. Por lo tanto, es considerada un nominador filogenético en el campo de la evolución molecular (Daugaard et al., 2007). Los genes *HSP70* comparten varias características entre organismos, por ejemplo: los genes carecen de intrones, la región amino-terminal conservada corresponde al dominio de unión del ATP mientras que la región carboxi-terminal al dominio de unión del sustrato (Giannetto et al., 2017).

Un estudio realizado por Tang (2016), en donde evaluó las secuencias proteicas obtenidas a partir de la traducción de diferentes genes que codifican para Hsp70 en *P. patens* comparados con los genes *Hsp70*, ya descritos, de *A. thaliana*, confirman que la secuencia proteica obtenida en este ensayo corresponde, desde aminoácido 11, al dominio de unión al sustrato, el cual consta de aproximadamente 200 aminoácidos altamente conservados entre las especies (Tang et al., 2016). Adicionalmente, Hsp70 es considerada una proteína versátil, debido a la cantidad de sustratos a los que se puede unir (por ejemplo, proteínas de membrana) porque se une a un segmento corto de los polipéptidos del sustrato, por lo que la región activa de esta proteína no se ve limitada por el tamaño de los mismos, a diferencia de HSP60 que encierra a sus sustratos enteros o en partes. El dominio de unión al sustrato consiste en un sub dominio en forma de hoja plegada β de ~25kDa, está compuesto por láminas β con bucles salientes, tomando la forma de un barril β mismo que encierra la estructura peptídica del sustrato, y un sub dominio circular de ~10kDa (Sharma & Masison, 2009). Se comprueba que la misma pertenece al grupo de Hsp70 que han sido reportadas.

De igual forma, al realizar un blastp, la secuencia de aminoácidos obtenida, tuvo un valor del 91 % de identidad con la secuencia proteica de *C. Papaya* (Scontig1398 Hsp70). El 75,86 % de similitud obtenido con la proteína HSC70 de bovino y 91 % obtenido con la secuencia de *C. papaya*, confirma que este tipo de proteína es altamente conservada entre las especies y que, por lo tanto, su rol como chaperona para proteger al organismo frente a diferentes tipos de

estrés, se cumple en todos ellos. En los humanos, Hsp70, ha sido estudiada como estrategia para tratar enfermedades como el cáncer, neurodegenerativas y enfermedades infecciosas (Rey-ladino, Senok, Sarkar, & Shedoukhy, 2015).

La mayoría de organismos eucariotas contienen múltiples Hsp70 homólogas, que están localizadas en diversos compartimientos de las células, como: el citoplasma, retículo endoplasmático, mitocondria y cloroplastos (Boston, Viitanen, & Vierling, 1996). Adicionalmente existen homólogos de Hsp70, denominados como HSC70, que están constitutivamente expresadas en el citoplasma de células eucariotas. Estas proteínas cumplen su función como chaperonas bajo condiciones normales (Xu, Zhan, & Huang, 2011). Hsc70 están involucradas en el plegamiento de polipéptidos sintetizados *de novo* y en la translocación de proteínas. Un estudio realizado en plantas transgénicas de *A. thaliana*, demostró que la sobre expresión de Hsc70 ayudó a la planta a desarrollar mayor termotolerancia, sin embargo, cuando su expresión se redujo las líneas transgénicas no sobrevivieron. Por lo tanto concluyen que la alteración en la expresión de Hsc70, resulta negativa para el crecimiento y desarrollo de la planta (Sung & Guy, 2003). La termotolerancia que presentan las plantas ha sido adquirida para poder hacer frente a tal estrés.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se describió por primera vez, una secuencia parcial del gen que codifica para Hsp70 en *V. pubescens*, considerada una especie subutilizada, propia de climas fríos y que, según los resultados obtenidos en este estudio, es capaz de tolerar temperaturas de calor extremas de hasta 55 °C durante horas.

Se realizó una caracterización del gen *in silico*, en donde se determinó y comprobó que la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos pertenece a la proteína Hsp70 altamente conservada entre especies. La sobre expresión de *HSP70* en *V. pubescens* frente a temperaturas extremas de calor, nos permiten concluir que el rol de chaperona que cumple esta proteína, confiere a este tipo de planta tolerancia al calor.

Al analizar fenotípicamente las plántulas de *V. pubescens* se observó que presentaron un decaimiento notorio de hojas y peciolo en las dos temperaturas de estrés evaluadas (45 °C y 55 °C), sin embargo el tallo continuaba erguido, sugiriendo que la planta podría ser capaz de tolerar mayor tiempo de exposición o una mayor temperatura.

La fuga de electrolitos comprobó que *V. pubescens* es capaz de tolerar 4 horas a 55 °C, con tan solo el 35,29 % de fuga de electrolitos.

Al no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, $p= 0,0366$, y la actividad de la enzima catalasa, se asume que: i) Otras enzimas y compuestos no enzimáticos antioxidantes están actuando para eliminar las especies reactivas del oxígeno, entre ellas, el peróxido de hidrógeno. ii) Existe una desnaturalización de la enzima a medida que aumenta la temperatura. iii) El mecanismo de tolerancia de *V. pubescens*, intenta mantener la actividad de esta enzima bajo control.

El aumento en el contenido de prolina libre, verifica que, *V. pubescens*, adopta este tipo de mecanismo para adquirir tolerancia frente al estrés por calor. La prolina al ser un soluto compatible, puede actuar como: antioxidante no

enzimático, chaperona de bajo peso molecular o como osmo-regulador para la planta. Todas estas características confieren a la planta mayor tolerancia al calor.

5.2 Recomendaciones

En la presente investigación se evaluó el comportamiento de plántulas de *V. pubescens* con estrés de calor directo por 4 horas. Sin embargo, se desconoce el comportamiento de esta planta en periodos de recuperación después del estrés. Por lo que, se recomienda evaluar los perfiles de expresión y las pruebas bioquímicas antes mencionadas para determinar el comportamiento de esta planta, en recuperación.

Ecuador presenta 16 de las 21 especies descritas para *Vasconcellea*. Al tener la mayor diversidad de esta especie, se recomienda evaluar el comportamiento que tiene *V. pubescens* en comparación con demás plantas de su misma especie, para de esta forma determinar si existen variedades con comportamientos iguales o diferentes que podrían resultar de interés científico.

Para obtener información que justifique el comportamiento de la actividad de la enzima catalasa evaluada en el presente ensayo, se recomienda medir la cantidad de peróxido de hidrógeno presente después del ensayo térmico, de esta forma se descartaría o confirmaría que el mismo pueda estar siendo eliminado por otras rutas metabólicas de la planta.

El aumento de prolina, evidencia que es un factor positivo para aumentar la termotolerancia de la planta. Sin embargo, este osmolito puede cumplir muchas funciones que pueden estar ayudando a la planta a ejercer dicha propiedad. Por lo tanto se recomienda realizar pruebas de potencial osmótico, detección de OH^+ o contenido de agua en la hoja, que permitiría obtener mayor información sobre el papel que está cumpliendo la prolina en la planta.

En el presente estudio se determinó que existe una sobre expresión del gen que codifica para Hsp70, sin embargo al ser una proteína chaperona, se recomienda evaluar el contenido específico de esta proteína a través de

técnicas de inmunodetección como, Western-Blot o ELISA, para poder corroborar los datos obtenidos a nivel molecular.

REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). *Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology*, 105(1947), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Al-Whaibi, M. H. (2011). *Plant heat-shock proteins: A mini review. Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022>
- Angel Rafael Morales Astudillo, Darwin Leonardo Medina Medina, B. D. Y. C. (2004). *Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus Vasconcella in Southern Ecuador. Lyonia*, 7(2), 15–27. Recuperado el 30 de abril del 2018 de http://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article_240/pdf/article.pdf
- Aradhya, M., & Manshardt, R. (1999). *A phylogenetic analysis of the genus Carica L.(Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. Genetic Resources*. Recuperado el 11 de mayo del 2018 de <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008786531609>
- Baeza, G., Correa, D., & Salas, C. (1990). *Proteolytic enzymes in Carica candamarcensis. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740510102>
- Bahuguna, R. N., & Jagadish, K. S. V. (2015). *Temperature regulation of plant phenological development. Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.10.007>
- Bajji, M., Kinet, J. M., & Lutts, S. (2002). *The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. Plant Growth Regulation*, 36(1), 61–70. <https://doi.org/10.1023/A:1014732714549>
- BassiriRad, H. (2000). *Research Review: Kinetics of Nutrient Uptake by Roots: Responses to Global Change. The New Phytologist*, 147(1), 155–169. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00682.x>

- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). *Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Benlloch-González, M., Quintero, J. M., Suárez, M. P., Sánchez-Lucas, R., Fernández-Escobar, R., & Benlloch, M. (2016). *Effect of moderate high temperature on the vegetative growth and potassium allocation in olive plants. Journal of Plant Physiology*, 207, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.001>
- Binelli, G., & Mascarenhas, J. P. (1990). *Arabidopsis: sensitivity of growth to high temperature. Developmental Genetics*, 11, 294–298. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020110408>
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M. E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., ... Fernie, A. R. (2014). *The genome of the stress-tolerant wild tomato species Solanum pennellii. Nature Genetics*, 46(9), 1034–1038. <https://doi.org/10.1038/ng.3046>
- Boston, R. S., Viitanen, P. V., & Vierling, E. (1996). *Molecular chaperones and protein folding in plants. Plant Molecular Biology*, 32(1–2), 191–222. <https://doi.org/10.1007/BF00039383>
- Box, E. O. (2016). *Vegetation Structure and Function at Multiple Spatial, Temporal and Conceptual Scales*. In *World Bioclimatic Zonation* (pp. 3–52). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-21452-8>
- Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuña, C., & Jamett, F. (2015). *High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulfuraphane and fatty acids from Chilean papaya (Vasconcellea pubescens) seeds: Effects of extraction conditions and methods. LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.057>
- Calderwood, S. K., & Asea, A. A. . (2016). *Heat Shock Proteins and Plants* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46340-7>
- Carey, C. C., Gorman, K. F., & Rutherford, S. (2006). *Modularity and intrinsic*

- evolvability of Hsp90-buffered change. PLoS ONE*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000076>
- Chen, Z., Cuin, T. A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B. P., & Shabala, S. (2007). *Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. Journal of Experimental Botany*, 58(15–16), 4245–4255. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm284>
- Chomczynski, P. (1987). *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction*, 159, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., & Del Río, L. A. (2001). *Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. Trends in Plant Science*, 6(4), 145–150. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01898-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01898-2)
- Costa Rabelo, F., Nair, T., Pereira, S., Paula, A., Gabriel, C., & Pereira, M. G. (2011). *NOTE ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya. Biotechnology*, 1–6. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332011000400009>
- Craig, E. A., & Marszalek, J. (2017). *How Do J-Proteins Get Hsp70 to Do So Many Different Things? Trends in Biochemical Sciences*, 42(5), 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.007>
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). *Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. BMC Plant Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- Cvikrová, M., Gemperlová, L., Dobrá, J., Martincová, O., Prásil, I. T., Gubis, J., & Vanková, R. (2012). *Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. Plant Science*, 182(1), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.016>
- Daugaard, M., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2007). *The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct*

- functions. FEBS Letters, 581(19), 3702–3710.*
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). *Plant salt-tolerance mechanisms. Trends in Plant Science, 19(6), 371–379.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin, V. (2014). *Stress-induced electrolyte leakage: The role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. Journal of Experimental Botany, 65(5), 1259–1270.* <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
- Dong, X., Yi, H., Lee, J., Nou, I.-S., Han, C.-T., & Hur, Y. (2015). *Global Gene-Expression Analysis to Identify Differentially Expressed Genes Critical for the Heat Stress Response in Brassica rapa. Plos One, 10(6), e0130451.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130451>
- El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M., & Looze, Y. (2001). *Revisiting the enzymes stored in the laticifers of Carica papaya in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences, 58(4), 556–570.* <https://doi.org/10.1007/PL00000881>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). *Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. Regulation, 11(4), 861–905.* <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2013). *Redox Signaling in Plants. Antioxidants & Redox Signaling, 18(16), 2087–2090.* <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5278>
- Fragkostefanakis, S., Röth, S., Schleiff, E., & Scharf, K. D. (2015). *Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. Plant, Cell and Environment, 38(9), 1881–1895.* <https://doi.org/10.1111/pce.12396>

- Fu, J., Yang, X. Y., Cheng, M. J., Lü, G. H., Wang, P., Wu, Y. Q., ... Tang, Q. L. (2015). *Perennial aneuploidy as a potential material for gene introgression between maize and Zea perennis*. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(5), 839–846. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60874-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60874-1)
- Gaete-Eastman, C., Figueroa, C. R., Balbontín, C., Moya, M., Atkinson, R. G., Herrera, R., & Moya-León, M. A. (2009). *Expression of an ethylene-related expansin gene during softening of mountain papaya fruit (Vasconcellea pubescens)*. *Postharvest Biology and Technology*, 53(1–2), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.03.007>
- Garty, J., Weissman, L., Tamir, O., Beer, S., Cohen, Y., Karnieli, A., & Orlovsky, L. (2000). *Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen Ramalina lacera exposed to air pollution*. *Physiologia Plantarum*, 109(4), 410–418. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100407.x>
- Giannetto, A., Oliva, S., Mazza, L., Mondello, G., Savastano, D., Mauceri, A., & Fasulo, S. (2017). *Molecular characterization and expression analysis of heat shock protein 70 and 90 from Hermetia illucens reared in a food waste bioconversion pilot plant*. *Gene*, 627, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.006>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Granier, C., Massonnet, C., Turc, O., Muller, B., Chenu, K., & Tardieu, F. (2002). *Individual leaf development in Arabidopsis thaliana: A stable thermal-time-based programme*. *Annals of Botany*, 89(5), 595–604. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf085>
- Gray, S. B., & Brady, S. M. (2016). *Plant developmental responses to climate change*. *Developmental Biology*, 419(1), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.023>

- Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Zhai, Y. F., Gong, Z. H., & Lu, M. H. (2016). *Genome-wide analysis of the Hsp70 family genes in pepper (Capsicum annuum L.) and functional identification of CaHsp70-2 involvement in heat stress*. *Plant Science*, 252, 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.001>
- Gupta, D., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2015). *Reactive oxygen species and oxidative damage*. *Toxicologist 2000 Mar*;54(1):4-5. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20421-5>
- Gupta, N. K., Agarwal, S., Agarwal, V. P., Nathawat, N. S., Gupta, S., & Singh, G. (2013). *Effect of short-term heat stress on growth, physiology and antioxidative defence system in wheat seedlings*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(6), 1837–1842. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1221-1>
- Guy, C. L., & Li, Q.-B. (1998). *The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family*. *The Plant Cell Online*, 10(4), 539–556. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.4.539>
- Hafren, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., & Makinen, K. (2010). *HSP70 and Its Cochaperone CPIP Promote Potyvirus Infection in Nicotiana benthamiana by Regulating Viral Coat Protein Functions*. *The Plant Cell*, 22(2), 523–535. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072413>
- Hakim, Ullah, A., Hussain, A., Shaban, M., Khan, A. H., Alariqi, M., ... Munis, M. F. H. (2018). *Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.012>
- Hameed, A., Goher, M., & Iqbal, N. (2012). *Heat Stress-Induced Cell Death, Changes in Antioxidants, Lipid Peroxidation, and Protease Activity in Wheat Leaves*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(3), 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9238-4>
- Hänsch, R., Lang, C., Riebeseel, E., Lindigkeit, R., Gessler, A., Rennenberg,

- H., & Mendel, R. R. (2006). *Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂: Combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6884–6888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513054200>
- Hare, P. D., & Cress, W. A. (1997). *Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants*. *Plant Growth Regulation*, 21(2), 79–102. <https://doi.org/10.1023/A:1005703923347>
- Harsh, A., Sharma, Y. K., Joshi, U., Rampuria, S., Singh, G., Kumar, S., & Sharma, R. (2016). *Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (Vigna aconitifolia)*. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2016.02.001>
- Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). *Temperature extremes: Effect on plant growth and development*. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2015.08.001>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemini, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). *Role of proline under changing environments: A review*. *Plant Signaling and Behavior*, 7(11), 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hu, Y. Q., Liu, S., Yuan, H. M., Li, J., Yan, D. W., Zhang, J. F., & Lu, Y. T. (2010). *Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H₂O₂ using promoter- and 3'-untranslated region exchange experiments in the Arabidopsis cat2 photorespiratory mutant*. *Plant, Cell and Environment*, 33(10), 1656–1670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02171.x>
- IPCC, 2014 IPCC, 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (Eds.)]*. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp. Recuperado el 15 de abril del 2018 de <https://www.ipcc.ch/pdf/assessment->

report/ar5/wg2/ar5_wgll_spm_es.pdf

- Jacob, P., Hirt, H., & Bendahmane, A. (2017). *The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance*. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 405–414. <https://doi.org/10.1111/pbi.12659>
- Jagadish, S. V. K., Craufurd, P. Q., & Wheeler, T. R. (2008). *Phenotyping parents of mapping populations of rice for heat tolerance during anthesis*. *Crop Science*, 48(3), 1140–1146. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.10.0559>
- Jha, U. C., Bohra, A., & Singh, N. P. (2014). *Heat stress in crop plants: Its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance*. *Plant Breeding*, 133(6), 679–701. <https://doi.org/10.1111/pbr.12217>
- Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., ... Sreenivasulu, N. (2005). *Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance*. *Current Science*, 88(3), 424–438. <https://doi.org/http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.471.372&rep=rep1&type=pdf>.
- Khair, T. S. A. B., & Karim, M. F. (2015). *The use of electrolyte leakage procedure in assessing heat and salt tolerance of Ruzaiz date palm (Phoenix dactylifera L.) cultivar regenerated by tissue culture and offshoots and treatments to alleviate the stressful injury*. *Journal of Horticulture and Forestry*, 7(4), 104–111. <https://doi.org/10.5897/JHF2014.0378>
- Koizumi, S., Ohama, N., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). *Functional analysis of the Hikeshi-like protein and its interaction with HSP70 in Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.128>

- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., & Kohno, K. (2004). *Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex*. *Plant Journal*, *37*(3), 370–378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01968.x>
- Körner, C., & Hiltbrunner, E. (2018). *The 90 ways to describe plant temperature*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *30*, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2017.04.004>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2011). *Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response*. *Journal of Proteomics*, *74*(8), 1301–1322. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>
- Kumar, R. R., Goswami, S., Gupta, R., Verma, P., Singh, K., Singh, J. P., ... Rai, R. D. (2016). *The Stress of Suicide: Temporal and Spatial Expression of Putative Heat Shock Protein 70 Protect the Cells from Heat Injury in Wheat (Triticum aestivum)*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *35*(1), 65–82. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9508-7>
- Kumar, R. R., & Rai, R. D. (2014). *Can Wheat Beat the Heat: Understanding the Mechanism of Thermotolerance in Wheat (Triticum aestivum L.)*. *Cereal Research Communications*, *42*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1556/CRC.42.2014.1.1>
- Lange, A. A. H., & Lange, A. H. (1961). *The Effect of Temperature and Photoperiod on the Growth of Carica Papaya*, *42*(3), 481–486. Recuperado el 25 de mayo del 2018 de <http://www.jstor.org/stable/1932233>
- Liu, X.Z. and Huang, B.R. (2000) *Heat Stress Injury in Relation to Membrane Lipid Peroxidation in Creeping Bentgrass*. *Crop Science*, *40*, 503-510. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2000.402503x>
- Lobell, D. B., Schlenker, W., & Costa-Roberts, J. (2011). *Climate trends and global crop production since 1980*. *Science*, *333*(6042), 616–620. <https://doi.org/10.1126/science.1204531>

- Manzano, A. R. (2008). De la ciencia popular a la industria : la variedad cubana de papaya “ Maradol ,” 1–23. Recuperado el 27 de mayo del 2018 de http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2010-2/7.pdf
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). *Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants*. *Current Science*, 82(5), 525–532.
- Mayer, M. P. (2010). *Gymnastics of molecular chaperones*. *Molecular Cell*, 39(3), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.012>
- Meehl, G. A., Stocker, T. F., Collins, W. D., Friedlingstein, A. T., Gaye, A. T., Gregory, J. M., ... Zhao, Z. (2007). *Global Climate Projections*. Cambridge University Press, Cambridge, 1–88. <https://doi.org/10.1080/07341510601092191>
- Millar, H., Considine, M. J., Day, D. A., & Whelan, J. (2001). *Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants*. *IUBMB Life*, 51(4), 201–205. <https://doi.org/10.1080/152165401753311735>
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., ... Alam, M. (2008). *The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (Carica papaya Linnaeus)*. *Nature*, 452(7190), 991–996. <https://doi.org/10.1038/nature06856>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). *Reactive oxygen gene network of plants*. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Morimoto, R. I. (1998). *Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators*. *Genes and Development*, 12(24), 3788–3796. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3788>
- Moya-León, M. A., Moya, M., & Herrera, R. (2004). *Ripening of mountain papaya (Vasconcellea pubescens) and ethylene dependence of some ripening events*. *Postharvest Biology and Technology*, 34(2),

211–218. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.05.005>

- Mugita, N., Nambu, T., Takahashi, K., Wang, P. L., & Komasa, Y. (2017). *Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro*. *Archives of Oral Biology*, *82*, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.035>
- Overdieck, D. (2016). *CO₂, Temperature, and Trees*. (Y. Iwasa, Ed.). Berlin: Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1860-2>
- Park, C.-J., & Seo, Y.-S. (2015). *Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity*. *The Plant Pathology Journal*, *31*(4), 323–333. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>
- Peña, D., Villena, P., Aguirre, A.-J., & Jiménez, C. (2017). Diversidad genética de accesiones de la familia Caricaceae en el sur de Ecuador. *Maskana*, *8*(1), 85–102. <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.08>
- Rasheed, R., Wahid, A., Farooq, M., Hussain, I., & Basra, S. M. A. (2011). *Role of proline and glycinebetaine pretreatments in improving heat tolerance of sprouting sugarcane (Saccharum sp.) buds*. *Plant Growth Regulation*, *65*(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9572-3>
- Rey-ladino, J., Senok, A., Sarkar, A., & Shedoukhy, A. Al. (2015). *Heat Shock Protein-Based Therapies*, *9*, 95–117. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-17211-8>
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2004). *Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *79*(4), 560–564. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511805>
- Sabehat, A., Weiss, D., & Lurie, S. (1996). *The Correlation between Heat-Shock Protein Accumulation and Persistence and Chilling Tolerance in Tomato Fruit*. *Plant Physiol*, *79961*(1544), 531–537. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.531>

- Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., & Sage, R. F. (2015). *The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. Field Crops Research, 182*, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.06.011>
- Sahu, K., Kaurav, M., & Pandey, R. S. (2017). *Protease loaded permeation enhancer liposomes for treatment of skin fibrosis arisen from second degree burn. Biomedicine and Pharmacotherapy, 94*, 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.141>
- Sarkar, N. K., Kundnani, P., & Grover, A. (2013). *Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (Oryza sativa). Cell Stress and Chaperones, 18(4)*, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0395-6>
- Sarwat, M., Ahmad, A., & Abdin, M. Z. (2013). *Stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective, volume 1. Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 1 (Vol. 2)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6372-6>
- Scarpeci, T. E., Zanol, M. I., & Valle, E. M. (2008). *Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. Plant Signaling & Behavior, 66(4)*, 856–857. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9274-4>
- Scheldeman, X., Kyndt, T., Geo, C., Ming, R., Rod, D., Van Droogenbroeck, B., ... Moore, P. H. (2011). *Vasconcellea. Wild Crop Relatives; Genomic and Breeding Resources*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20447-0>
- Scheldeman, X., Willemsen, L., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Romeijn-Peeters, E., Restrepo, M. T., Romero Motoche, J., ... Goetgebeur, P. (2007). *Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (Vasconcellea spp.) in tropical and subtropical America. Biodiversity and Conservation, 16(6)*, 1867–1884. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9086-x>
- Sharma, D., & Masison, D. C. (2009). *Hsp70 structure, function, regulation and*

- influence on yeast prions. Protein and Peptide Letters, 16(6), 571–581. <https://doi.org/10.2174/092986609788490230>*
- Simirgiotis, M. J., Caligari, P. D. S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2009). *Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. Food Chemistry, 115(2), 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.071>*
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2003). *The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecology Letters, 6(11), 1025–1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>*
- Su, P.-H., & Li, H. -m. (2010). *Stromal Hsp70 Is Important for Protein Translocation into Pea and Arabidopsis Chloroplasts. The Plant Cell Online, 22(5), 1516–1531. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071415>*
- Sun, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). *Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1577(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00417-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00417-7)*
- Sung, D. Y., & Guy, C. L. (2003). *Physiological and Molecular Assessment of Altered Expression of. Society, 132(June), 979–987. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019398>*
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology (Third Edition). Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 67-86. <http://doi.org/10.1093/aob/mcg079>*
- Tang, T., Yu, A., Li, P., Yang, H., Liu, G., & Liu, L. (2016). *Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. Scientific Reports, 6(April), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep33650>*
- Truman, A. W. (2017). *Cracking the Chaperone Code: Cellular Roles for Hsp70 Phosphorylation. Trends in Biochemical Sciences, xx, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.002>*

- Vale, E., Heringer, A., Barroso, T., Ferreira, A., da Costa, M., Perales, J. E., ...
Silveira, V. (2014). *Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in Carica papaya L. Proteome Science*, 12(1), 37.
<https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-37>
- Vierling, E. (1991). *The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. Environment*, 579–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051>
- Wang, H., Li, K., Zhu, J. Y., Fang, Q., Ye, G. Y., Wang, H., ... Zhu, J. Y. (2012). *Cloning and expression pattern of heat shock protein genes from the endoparasitoid wasp, pteromalus puparum in response to environmental stresses. Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79(4–5), 247–263. <https://doi.org/10.1002/arch.21013>
- Wang, H., Zhang, Z., Xu, L., Huang, X., & Pang, X. (2012). *The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2624–2629. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5676>
- Wang, J., Juliani, H. R., Jespersen, D., & Huang, B. (2017). *Differential profiles of membrane proteins, fatty acids, and sterols associated with genetic variations in heat tolerance for a perennial grass species, hard fescue (Festuca Trachyphylla). Environmental and Experimental Botany*, 140, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.014>
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). *Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science*, 9(5), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang, X.-R., Wang, C., Ban, F.-X., Zhu, D.-T., Liu, S.-S., & Wang, X.-W. (2017). *Genome-wide identification and characterization of HSP gene superfamily in whitefly (Bemisia tabaci) and expression profiling analysis under temperature stress. Insect Science*, 1–38. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12505>
- Wang, Y., Lin, S., Song, Q., Li, K., Tao, H., Huang, J., ... He, H. (2014).

Genome-wide identification of heat shock proteins (Hsps) and Hsp interactors in rice: Hsp70s as a case study. BMC Genomics, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-344>

Waters, E. R. (2013). *The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. Journal of Experimental Botany, 64(2), 391–403.*
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers355>

Waters, E. R., Lee, G. J., & Vierling, E. (1996). *Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. Journal of Experimental Botany, 47(296), 325–338.*

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., ... Van Camp, W. (1997). *Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. EMBO Journal, 16(16), 4806–4816.*
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>

Wilson, R. A., Sangha, M. K., Banga, S. S., Atwal, A. K., & Gupta, S. (2014). *Heat stress tolerance in relation to oxidative stress and antioxidants in Brassica juncea. Journal of Environmental Biology, 35(March), 383–387.* <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.64.0419XX>

Wu, X., Wang, J., Na, J. K., Yu, Q., Moore, R. C., Zee, F., ... Ming, R. (2010). *The origin of the non-recombining region of sex chromosomes in Carica and Vasconcellea. Plant Journal, 63(5), 801–810.*
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04284.x>

Xu, Y., Wang, J., Bonos, S. A., Meyer, W. A., & Huang, B. (2018). *Candidate genes and molecular markers correlated to physiological traits for heat tolerance in fine fescue cultivars. International Journal of Molecular Sciences, 19(1), 1–21.*
<https://doi.org/10.3390/ijms19010116>

Xu, Y., Zhan, C., & Huang, B. (2011). *Heat Shock Proteins in Association with Heat Tolerance in Grasses. International Journal of Proteomics, 2011, 1–11.* <https://doi.org/10.1155/2011/529648>

- Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2002). *Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4097–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.052564899>
- Zavala-López, M., López-Tavera, E., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Serna-Saldívar, S. O., & García-Lara, S. (2018). *Screening of major phenolics and antioxidant activities in teosinte populations and modern maize types*. *Journal of Cereal Science*, 79, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.11.007>
- Zhang, J., Liu, B., Li, J., Zhang, L., Wang, Y., Zheng, H., ... Chen, J. (2015). *Hsf and Hsp gene families in Populus: Genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses*. *BMC Genomics*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1398-3>
- Zhu, X., Li, X., Zou, Y., Chen, W., & Lu, W. (2012). *Cloning, characterization and expression analysis of δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene in harvested papaya (*Carica papaya*) fruit under temperature stress*. *Food Research International*, 49(1), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.003>
- Zou, M., Yuan, L., Zhu, S., Liu, S., Ge, J., & Wang, C. (2016). *Response of osmotic adjustment and ascorbate-glutathione cycle to heat stress in a heat-sensitive and a heat-tolerant genotype of wucai (*Brassica campestris* L.)*. *Scientia Horticulturae*, 211, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.011>

ANEXOS

Anexo 1. ANOVA realizado para el análisis del porcentaje de fuga de electrolitos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	Valor F	Pr (>F)	
Temperatura	2	0,01365	0,006826	30,39	6,95e ⁻¹⁰	***
Residuals	61	0,01370	0,00025	-	-	-

Anexo 2. Prueba de comparación de medias de Tukey para el análisis del porcentaje de fuga de electrolitos. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un valor $p=0.01$

Tratamientos	Media (1/x)	Media	Nivel de confianza: 0,01
25	0.06262	15.9693	a
45	0.04158	24.0500	b
55	0.02833	35.2982	c

Anexo 3. ANOVA realizado para el análisis de la actividad de la enzima catalasa.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	Valor F	Pr (>F)	
Temperatura	2	9,78	4,89	3,493	0,0366	*
Residuals	61	85,40	1,40	-	-	-

Anexo 4. Prueba de comparación de medias de Tukey para el análisis de la actividad de la enzima catalasa. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un valor $p=0.01$

Tratamientos	Media	Nivel de confianza: 0,01
25	2.6476	a
45	2.7054	b
55	1.7658	c

Anexo 5. ANOVA realizado para el análisis del contenido de prolina libre

	Df	Sum Sq	Mean Sq	Valor F	Pr (>F)	
Temperatura	2	40,88	20,442	33,45	2,18e ⁻¹⁰	***
Residuals	58	35,44	0,611	-	-	-

Anexo 6. Prueba de comparación de medias de Tukey para el análisis del contenido de prolina libre. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un valor $p=0.01$

Tratamientos	Media (1/x)	Media	Nivel de confianza: 0,01
25	2.6526	0.3769	a
45	1.5213	0.6574	b
55	0.7119	1,4046	c

Anexo 7. Concentraciones de ARN obtenidos a partir de la extracción de plántulas de *V. pubescens*.

Primera repetición biológica				
Temperatura	Planta	Peso seco (mg)	Concentración de ARN (ng/ul)	260/280
25°C	1	150,6	330,7	2,09
	2	81,3	143,6	1,99
	3	142,8	188,2	2,02
	4	150,9	638,1	2,12
45°C	1	100,4	383,4	2,12
	2	150,4	760,8	2,12
	3	149,9	144,2	2,08
	4	150,0	306,9	2,10
Segunda repetición biológica				
25°C	1	150,0	169,5	2,09
	2	150,5	129,3	2,03
	3	150,6	175,4	2,03
	4	150,6	165,1	2,12
55°C	1	149,7	255,2	2,10
	2	150,5	170,6	2,00
	3	150,5	149,5	2,13
	4	150,4	497,0	2,01

Anexo 8. ANOVA realizado para el análisis de la expresión relativa de Hsp70 respecto a *Vp18S*.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	Valor F	Pr (>F)	
Temperatura	2	51,14	25,568	30,83	5,64e ⁻¹⁰	***
Residuals	21	17,41	0,829	-	-	-

Anexo 9. Prueba de comparación de medias de Tukey el análisis de la expresión relativa de Hsp70 respecto a Vp18S. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un valor $p=0.01$

Tratamientos	Medias	Nivel de confianza: 0,01
25	1,278	b
45	3,67	a
55	4,776	a

