



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DEL DAÑO OXIDATIVO GENERADO SOBRE LOS COMPUESTOS  
SOLUBLES EN PLÁNTULAS DE *Vasconcellea pubescens* SOMETIDAS A  
CONDICIONES DE ESTRÉS POR INCREMENTO DE TEMPERATURA

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

Profesor guía

Fabio Marcelo Idrovo Espín, PhD.

Autor

Eduardo Darío Arizala Quinto

Año

2016

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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 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.

---

Eduardo Darío Arizala Quinto  
CI.: 1721447926

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a mi madre por brindarme su apoyo, cariño y compañía a lo largo de mi carrera estudiantil.

De manera especial y sincera agradezco a mi profesor guía Dr. Fabio Idrovo por todo el conocimiento, paciencia y ayuda otorgada durante el desarrollo del presente trabajo de titulación. De igual manera, a la Dra. Gabriela Viteri por su aporte invaluable y sus valiosos consejos cuando más los necesité.

Agradezco también a mi amiga quien durante toda la carrera siempre estuvo ahí, en las buenas y malas, gracias Adriana Larrea.

Por último, quiero expresar mi enorme gratitud a Marcela Vásquez, a quien admiro y respeto, gracias amiga por tu apoyo.

## **DEDICATORIA**

Para la mujer que me dio la vida, que me supo educar, guiar y enseñarme que en la vida un verdadero vencedor es quien sabe levantarse y jamás se da por vencido. Sin su apoyo no sería lo que soy ahora, este trabajo te lo dedico con todo mi cariño y amor a ti mamá.

También dedico la presente investigación a mis amigas Adriana, Marcela y Mayra de quienes me llevo los mejores recuerdos, pues fueron ellas las que me motivaron a alcanzar mis metas y con quienes compartí momentos de alegrías, triunfos y tristezas durante mi carrera universitaria.

## RESUMEN

El estrés térmico afecta el crecimiento, desarrollo, producción y rendimiento de las plantas. *Vasconcellea pubescens* constituye un potencial recurso para la agrobiotecnología; no obstante, es susceptible a las altas temperaturas, sin mencionar que en el Ecuador es una especie relegada y sub-utilizada. El calentamiento global podría poner en riesgo de extinción a este frutal; por lo tanto, es indispensable conocer el daño oxidativo ocasionado por el estrés térmico, para con ello estudiar los mecanismos de percepción y tolerancia presentes en esta especie y a futuro desarrollar variedades termo tolerantes.

En la presente investigación se analizó en muestras foliares de *V. pubescens* varios parámetros bioquímicos en respuesta al daño oxidativo provocado por el estrés térmico directo y/o gradual. Las variables evaluadas fueron las siguientes: concentración total de proteína soluble, contenido de sólidos solubles totales, niveles relativos de grupos carbonilo y oxidación relativa de lípidos.

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron plántulas de *V. pubescens* de 75 días de edad. Las plántulas se indujeron por 4 horas a un estrés térmico directo a temperaturas de 33.5°C y 45°C. También se realizó otro ensayo, en el cual se sometió las plántulas de la misma edad a regímenes de temperatura gradual de 33.5°C/12 horas, 45°C/12 horas y una posterior etapa de recuperación de 72 horas. Para cada tipo de estrés evaluado se utilizó un control, que consistió en plántulas mantenidas a temperatura ambiente (~25°C).

El análisis de los ensayos fenotípicos y bioquímicos indican que luego de un estrés térmico gradual *V. pubescens* adquiere cierto grado de termo tolerancia, que se traduce en leves lesiones anatómicas, un aumento en la concentración de proteínas, menor carbonilación en sus compuestos solubles y niveles estables de peroxidación lipídica. Por el contrario, ante un choque térmico directo *V. pubescens* mostró susceptibilidad, exhibiendo graves lesiones en hojas, tallo y peciolo; además de altos niveles de carbonilación en sus compuestos solubles y un significativo daño oxidativo sobre los componentes lipídicos.

Los resultados de este proyecto constituyen las primeras evidencias en reportar a un nivel fenotípico y bioquímico, los efectos nocivos que puede causar el incremento de temperatura sobre la especie sub-tropical *V. pubescens*.

## ABSTRACT

Heat stress affects the growth, development, production and yield of plants. *Vasconcellea pubescens* represents a resource potential for crop biotechnology; however, it is susceptible to high temperatures not to mention that in Ecuador is a neglected and underutilized species. Global warming could put at risk of extinction this fruit. Therefore, it is essential to know what is the oxidative damage caused by thermal stress in order to study the perception and tolerance mechanisms present in this species and in future develop heat tolerant varieties.

In this research several biochemical parameters were analyzed in leaf samples of *V. pubescens* in response to oxidative damage caused by direct and/or gradual thermal stress. The variables evaluated were: total concentration of soluble protein, total soluble solids content, relative levels of carbonyl groups and relative lipid oxidation.

To develop this project *V. pubescens* seedlings of 75 days old were used. Seedlings were induced for 4 hours at a direct thermal stress at temperatures of 33.5 and 45°C. Another assay was also performed, in which seedlings of the same age was subjected to gradual heat regimes of 33.5°C/12 hours, 45°C/12 hours and a post recovery stage of 72 hours. A control, which consisted of seedlings kept at room temperature (~25°C) was used for each type of stress tested.

Phenotypic analysis and biochemical assays shown that following a gradual thermal stress *V. pubescens* acquires a sort of heat tolerance, resulting in mild anatomical lesions, increased protein concentration, lower soluble compounds carbonylation and steady lipid peroxidation levels. On the contrary, against a direct thermal shock *V. pubescens* displayed sensitivity exhibiting severe leaves, stems and petioles lesions as well as high levels of soluble compounds carbonylation and a significant oxidative damage to lipid components.

These results provide the first evidence about report the harmful effects that may cause the temperature increase on the subtropical species *V. pubescens* to a phenotypic and biochemical level.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.1.1 Generalidades del estrés térmico .....	1
1.1.2 <i>Vasconcellea pubescens</i> como especie de estudio .....	2
1.2 Problemática .....	3
1.3 Justificación .....	4
1.4 Objetivos .....	5
1.4.1 Objetivo general .....	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 Descripción del género <i>Vasconcellea</i> y la especie de estudio .....	6
2.1.1 Características fisiológicas de <i>Vasconcellea pubescens</i> .....	7
2.1.2 Distribución de <i>Vasconcellea pubescens</i> .....	8
2.1.3 Producción y conservación de <i>V. pubescens</i> .....	11
2.1.4 Propiedades, aplicaciones e interés biotecnológico de la especie	13
2.2 Estrés térmico .....	15
2.2.1 Generalidades y definición del estrés térmico .....	15
2.2.2 Impacto del estrés térmico sobre la fisiología y anatomía vegetal.	15
2.2.3 Mecanismos de respuesta y defensa utilizados por las plantas ....	17
2.2.4 Formación de estrés oxidativo .....	19
2.2.4.1 Carbonilación de proteínas .....	21
2.2.4.2 Oxidación de lípidos .....	22
2.2.5 Impacto del estrés térmico en los alimentos y la economía.....	23
3. METODOLOGÍA .....	26
3.1 Material vegetal .....	26
3.1.1 Desinfección de semillas de <i>V. pubescens</i> .....	26
3.1.2 Siembra de semillas de <i>V. pubescens</i> .....	26



3.2	Inducción de estrés por incremento de temperatura .....	27
3.2.1	Estrés térmico directo .....	27
3.2.2	Estrés térmico gradual.....	27
3.3	Ensayos bioquímicos .....	28
3.3.1	Procesamiento de las muestras foliares .....	28
3.3.2	Determinación de la concentración proteica por medio del ácido bicinconínico (BCA) .....	29
3.3.3	Medición del contenido de sólidos solubles totales .....	30
3.3.4	Medición relativa de carbonilos totales en respuesta al estrés térmico.....	30
3.3.5	Curva de calibración del compuesto formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona .....	31
3.3.6	Medición relativa de oxidación lipídica en respuesta al estrés térmico.....	33
3.4	Análisis estadístico .....	34
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	Germinación de semillas de <i>V. pubescens</i> .....	36
4.2	Respuesta al incremento directo de temperatura.....	36
4.2.1	Análisis de los ensayos bioquímicos correspondiente al estrés térmico directo .....	38
4.2.1.1	Contenido total de proteínas solubles .....	39
4.2.1.2	Contenido de sólidos solubles totales .....	40
4.2.1.3	Niveles relativos de carbonilación de los compuestos solubles .....	41
4.2.1.4	Niveles relativos de peroxidación lipídica respecto al contenido de MDA.....	43
4.3	Respuesta al incremento gradual de temperatura .....	44
4.3.1	Análisis de los ensayos bioquímicos correspondiente al estrés térmico gradual.....	47
4.3.1.1	Contenido total de proteínas solubles .....	48
4.3.1.2	Contenido de sólidos solubles totales .....	49

4.3.1.3 Niveles relativos de carbonilación de compuestos solubles .....	50
4.3.1.4 Niveles relativos de peroxidación lipídica respecto al contenido de MDA.....	51
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
5.1 Germinación en <i>V. pubescens</i> .....	53
5.2 Respuesta fenotípica de <i>V. pubescens</i> al estrés térmico directo y/o gradual .....	53
5.3 Cambios en los niveles de contenido proteico en dependencia del tipo de estrés térmico en <i>V. pubescens</i> .....	56
5.4 Acumulación de metabolitos de bajo peso molecular en respuesta al estrés térmico en <i>V. pubescens</i> .....	59
5.5 Oxidación relativa de los componentes solubles en <i>V. pubescens</i> .....	60
5.6 Oxidación relativa de lípidos en <i>V. pubescens</i> .....	63
5.7 Respuesta fisiológica luego del estrés térmico progresivo en <i>V. pubescens</i> .....	65
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>67</b>
6.1 Conclusiones.....	67
6.2 Recomendaciones .....	68
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>89</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 Generalidades del estrés térmico

Las plantas al ser organismos sésiles están expuestas a distintos tipos de estrés incluyendo: ataque de patógenos, salinidad, sequías y temperaturas extremas (Essemine, Ammar y Bouzid, 2010, p. 565; Pecinka y Scheid, 2012, p. 800). De estos, el aumento de temperatura es quizá uno de los factores abióticos que mayor repercusión tiene sobre la fisiología y la productividad vegetal (Hasanuzzaman, Kamrun y Fujita, 2013a, p. 169; Asthir, 2015, p. 202).

El estrés térmico promueve una serie de afectaciones drásticas sobre las plantas, entre las que constan: inhibición germinativa de las semillas, reducción de la fotosíntesis, pérdida de agua, quemaduras y una excesiva deshidratación en varios tejidos vegetales, alteración en el contenido de biomasa, desestabilización de las membranas biológicas y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, que a su vez termina ocasionando un estrés oxidativo sobre los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Hasanuzzaman, Nahar, Alam, Roychowdhury y Fujita, 2013b, p. 9644-9647). Estos efectos descritos provocan una notable reducción en el crecimiento de las plantas, un inadecuado desarrollo, decrecimiento en la producción y bajo rendimiento de los cultivos agrícolas (Bita y Gerats, 2013, pp. 1-2; Trivedi, 2015, p. 152).

Las plantas han desarrollado importantes mecanismos adaptativos con el propósito de tolerar los cambios de temperatura (Bita y Gerats, 2013, p. 6). Esta respuesta al estrés térmico se caracteriza principalmente por la activación de rutas específicas de señalización, cambios a nivel de transcripción y traducción, además de alteraciones fisiológicas y bioquímicas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9652-9655; Trivedi, 2015, pp. 152-153). Entre las principales estrategias usadas por las plantas para protegerse de los incrementos de temperatura se encuentran: la sobreexpresión y síntesis de proteínas relacionadas con el estrés térmico, la producción de enzimas y moléculas antioxidantes, la acumulación de osmolitos, entre otros metabolitos como carotenos, flavonoides, fenoles, esteroides y fitohormonas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9644; Awasthi,

Bhandari y Nayyar, 2014, pp. 8-10; Asthir, 2015, pp. 202, 207). Estos compuestos mitigan el impacto nocivo del estrés térmico a través del restablecimiento de la homeostasis celular y la protección de otros complejos moleculares (Wahid, Gelani, Ashraf y Foolad, 2007, pp. 210-211).

Sintetizando, el grado de supervivencia de las plantas frente a las severas condiciones de temperatura está asociado con la rapidez en que la especie vegetal perciba las alteraciones de temperatura, además de la habilidad y eficiencia con que se desencadenen las mejores respuestas bioquímicas y moleculares (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9643; Asthir, 2015, pp. 202-203).

### **1.1.2 *Vasconcellea pubescens* como especie de estudio**

La familia Caricaceae comprende miembros de herbáceas y árboles frutales de clima tropical y subtropical, de las que se conocen 6 géneros y 35 especies (Carvalho y Renner, 2014, pp. 82-83). El género *Vasconcellea* presenta la mayor cantidad de individuos, reportándose 21 especies referidas colectivamente como “papayas de alta montaña” o “papayuelos” (Schedelman *et al.*, 2011, pp. 215-217). Este género tiene una mayor relevancia en nuestro país, ya que de las 21 especies reportadas, 16 se encuentran en Ecuador (Schedelman *et al.*, 2007, p. 1873).

La especie *Vasconcellea pubescens*, conocida por las comunidades andinas como chamburo, representa una valiosa fuente de enzima papaína, vitaminas, polisacáridos y otros metabolitos catalogados como antioxidantes (Duarte y Paull, 2015, p. 207). Al respecto, se reportan interesantes aplicaciones de esta especie en sectores de la industria alimenticia y medicinal (Schedelman *et al.*, 2011, pp. 215-217). Asimismo, este frutal alberga significativos recursos genéticos, de entre los que destacan: genes de resistencia a virus y hongos, así como genes de tolerancia a los climas fríos, haciendo de *V. pubescens* una valiosa especie para programas de mejora en otros cultivares (Coppens d’Eeckenbrugge, Drew, Kyndt y Scheldeman, 2014, pp. 66-67).

Pese a las notables funcionalidades de *V. pubescens*, en el Ecuador, los cultivares de este frutal se consideran sub-utilizados o relegados (INIAP, 2003, pp. 25-26, 37). Por lo que al ser silvestre, podría esconder dentro de su material

genético otros genes aún desconocidos que podrían ser resistentes a plagas y patógenos, así como otras características adaptativas que pudieran extrapolarse a otras plantas de interés comercial (Tapia, Zambrano y Monteros, 2008, pp. 26-30). Todo lo descrito previamente posiciona a la especie *V. pubescens* como un destacado recurso fitogenético y biotecnológico para el país.

## 1.2 Problemática

El repentino cambio climático, las intensas olas de calor sumados al calentamiento global provocan un estrés térmico sobre las plantas (Abdallah, Moses y Prakash, 2014, p. 77; Hatfield y Prueger, 2015, pp. 4, 6). Este factor abiótico ejerce drásticas consecuencias a nivel fisiológico, bioquímico y molecular sobre la célula vegetal (Trivedi, 2015, p. 152). Uno de los mayores efectos nocivos de este estrés es que promueve un incremento en el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual afecta la homeostasis celular causando un daño severo sobre las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Cadet, Douki y Ravanay, 2010, p. 10; Hossain *et al.*, 2015, pp. 1-2). Tales daños desestabilizan la estructura celular, limitan el crecimiento de las plantas, ocasionan graves pérdidas en la producción y rendimiento de los cultivos (Bita y Gerats, 2013, pp.1-2) e incluso podrían conllevar a la extinción de importantes especies agrícolas (Abdallah *et al.*, 2014, p. 78). Dichos eventos pueden ocasionar escasez de alimentos poniendo en peligro la seguridad alimentaria a nivel local y mundial (Abdallah *et al.*, 2014, pp. 77-78); sin mencionar que se espera un incremento en la demanda global por alimentos de al menos un 50% entre el 2010 al 2050 (Tai, Martin y Heald, 2014, p. 1).

Battisti y Naylor, (2009, pp. 240-241) mencionan que a finales del siglo 21, los países de climas tropicales y subtropicales, como el Ecuador, experimentarán un severo incremento en las temperaturas estacionales. *Vasconcellea pubescens* al ser una especie frutal nativa de las altas montañas es susceptible a las altas temperaturas (Duarte y Paull, 2015, pp. 202-203); además, su cultivo es poco apreciado en el Ecuador y en general es una especie pobremente utilizada (INIAP, 2003, pp. 25-26, 37). Estos hechos podrían poner en peligro la preservación de esta especie, principalmente para las décadas venideras,

debido a que se esperan incrementos de temperatura aún más severos de acuerdo con Hatfield y Prueger (2015, p. 4).

### **1.3 Justificación**

Los daños provocados por el incremento de temperatura dependen de la especie, variedad e incluso del genotipo vegetal (Bita y Gerats, 2013, p. 2). En otras palabras, la respuesta de una planta frente al estrés térmico no será la misma que en otra. Esta es la razón por la que en esta investigación se analiza por primera vez el estrés oxidativo y daño fenotípico que puede ocasionar el aumento de temperatura en la especie *Vasconcellea pubescens*. Asimismo, los mecanismos adaptativos que manifiestan las plantas frente al estrés térmico están ligados a la duración, intensidad y la tasa de aumento de la temperatura (Hasanuzzaman *et al.*, 2013a, p. 169). Por tal motivo, la presente investigación pretende brindar un mayor conocimiento acerca de cómo el grado de afectación generado por el estrés térmico en *V. pubescens*, varía de acuerdo al modo de acción en que se suscite el incremento de temperatura, sea esta de forma directa o gradual.

El estudio propuesto tiene un mayor impacto dado que se realiza en una especie andina muy poco estudiada, de múltiples beneficios y que además, está ampliamente distribuida en el Ecuador.

Por último, los resultados obtenidos de este experimento permiten comprender cómo esta especie percibe el aumento de temperatura; además de los posibles mecanismos adaptativos que utiliza para hacer frente a tales condiciones. Esta información resulta indispensable y constituye una etapa primordial para en un futuro desarrollar variedades termo tolerantes, con el propósito de preservar esta importante especie y con ello evitar su extinción, una situación que pudiera ocurrir como consecuencia de las excesivas olas de calor que se pronostican para las próximas décadas, principalmente sobre los países tropicales (Wahid *et al.*, 2007, p. 201), como el caso del Ecuador. Asimismo, estos estudios pueden ser el pilar de futuras investigaciones en el área de biología molecular y posicionar a *V. pubescens* como un modelo vegetal de los frutales de clima subtropical andino.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Analizar el daño oxidativo generado sobre los compuestos solubles en plántulas de *Vasconcellea pubescens* sometidas a condiciones de estrés por incremento de temperatura.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

Cuantificar por espectrofotometría el contenido de proteína soluble total en plántulas de *Vasconcellea pubescens* inducidas a un estrés térmico mediante el método del ácido bicinconínico.

Determinar los niveles de oxidación presentes en los compuestos solubles de plántulas de *Vasconcellea pubescens* inducidas a un estrés térmico mediante la medida relativa de grupos carbonilo reactivos a la 2,4-dinitrofenilhidrazina por espectrofotometría.

Evaluar la oxidación relativa de lípidos en plántulas de *Vasconcellea pubescens* inducidas a un estrés térmico por medio de la medición de grupos malondialdehído reactivos al ácido tiobarbitúrico por espectrofotometría.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Descripción del género *Vasconcellea* y la especie de estudio

La familia Caricaceae compuesta por 6 géneros, alberga un total de 34 especies y un híbrido natural *Vasconcellea x heilbornii*, mejor conocido como babaco (Carvalho y Renner, 2014, pp. 82-83). Los miembros frutales del género *Vasconcellea* son los más numerosos dentro de Caricaceae, encontrándose 21 especies catalogadas como papayas de altura o papayas de alta montaña (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 213). Tales seudónimos son atribuidos a este género como consecuencia de su preferencia ecológica por las altas elevaciones, así como su semejanza morfológica con la papaya común (Kyndt *et al.*, 2005, p. 1033; Schedelman *et al.*, 2007, p. 1869).

A diferencia de la papaya, los cultivos pertenecientes al género *Vasconcellea* son poco aprovechados, y en efecto, esta es la razón por la que se califica a estos cultivos como relegados o sub-utilizados (Benítez, Lobo, Delgado y Medina, 2013, p. 188). Asimismo, debido a la escasa intervención del hombre, estas especies aún se consideran como silvestres, motivo por el cual pueden albergar características génicas y ciertos metabolitos de considerable importancia (Criollo, Muñoz y Portilla, 2004, p. 3).

*Vasconcellea* y *Carica* son quizá los géneros más cercanos de la familia Caricaceae, en parte, gracias a la posibilidad de hibridación entre las especies de ambos géneros y sus destacadas similitudes fisiológicas (Wu *et al.*, 2010, pp. 801-802). De hecho, los miembros del género *Vasconcellea* fueron considerados años atrás como subespecies del género *Carica* (Carvalho y Renner, 2012, pp. 46-47). No obstante, los estudios basados en técnicas moleculares vislumbraron una notable diferencia genética entre las especies de ambos géneros, acuñándose finalmente a *Vasoncellea* como un género propio (Van Droogenbroeck, 2004, pp. 1473-1474; Kyndt *et al.*, 2005, pp. 1033-1034; Kyndt, Van Droogenbroeck, Haegeman, Roldán-Ruíz y Gheysen, 2006, pp. 786-787).

Para el presente trabajo de titulación, la especie seleccionada dentro del género *Vasconcellea* fue *Vasconcellea pubescens*, también conocida con otros



sinónimos, tales como: *Carica candamarcensis*, *Carica pubescens*, *Carica cundinamarcensis* y *Vasconcellea cundinamarcensis* (Siddiq, Ahmed, Lobo y Ozadali, 2012, p. 302; Duarte y Paull, 2015, p. 202).

### **2.1.1 Características fisiológicas de *Vasconcellea pubescens***

*V. pubescens* es una especie arbórea dicotiledónea compuesta por nueve pares de cromosomas ( $2n = 18$ ) (Balbontín *et al.*, 2010, p. 5114; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 54). Su tallo es un tronco robusto, succulento, ramificado y pubescente, el cual puede crecer hasta los 3 y 7 metros de altura, encontrándose también plantas de 10 metros con un sistema radicular superficial (Carvalho, 2015, p. 124; Duarte y Paull, 2015, p. 203). Sus hojas son alternas, lobuladas y de envés pubescente llegando a medir de 34 a 40 centímetros de ancho y 17 a 34 cm de largo (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 214; Duarte y Paull, 2015, p. 203). Estas grandes hojas se concentran en la parte terminal de las ramas constituyendo una corona foliar a manera de palmera (Duarte y Paull, 2015, p. 203). Los peciolo que conectan las hojas al tallo de la planta son largos y pubescentes alcanzando medidas de 17 a 34 cm (Carvalho, 2015, p. 124; Duarte y Paull, 2015, p. 203).

*V. pubescens* al igual que *C. papaya* es una especie trioica (Wu *et al.*, 2010, p. 801); en otras palabras, presenta los tres tipos de formas sexuales: flores pistiladas, flores estaminadas y flores perfectas dispuestas en plantas separadas (Duarte y Paull, 2015, p. 203). De igual manera, se ha encontrado extraños casos de árboles andromonoicos; es decir, plantas que contienen en su estructura tanto flores hermafroditas como flores masculinas (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 53). Las plantas masculinas son frondosas y exhiben flores delgadas con un alargado y pubescente pedunculo floral, el cual contiene cinco sépalos, cinco pétalos de un color verdoso o blanco-amarillento, diez estambres y diez anteras (Duarte y Paull, 2015, p. 203). En contraste, las plantas femeninas no son tan frondosas, presentan largas flores pentámeras, cuyos pétalos pueden ser de color amarillo o blanco y un ovario superior, el cual está protegido por un corto estilo que se divide en cinco estigmas (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 214; Duarte y Paull, 2015, pp. 203-204).

Los frutos de *V. pubescens* son bayas ovoides de cinco lóbulos que miden de 3 a 8 cm de ancho y de 6 a 15 cm de largo, su corteza es de color verde y cambia a naranja o amarillo durante la maduración (Carvalho, 2015, p. 215; Duarte y Paull, 2015, p. 204). La pulpa de este fruto es amarillenta y desprende una agradable e intensa fragancia (Duarte y Paull, 2015, p. 204). Esta exótica fruta es considerada como un fruto climatérico con una baja cantidad de azúcar y un alto contenido de enzimas proteolíticas, además de otros metabolitos de valiosa utilidad (Moya-León y Herrera, 2004, p. 212; Duarte y Paull, 2015, p. 207).

Dentro de la cavidad central del fruto se encuentran un total de 100 a 200 semillas envueltas por una sustancia gelatinosa denominada mucílago (Duarte y Paull, 2015, p. 204). Estas semillas contienen un embrión recto cubierto por un endospermo proteico y graso que está protegido por una testa de color marrón-rojizo (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 214).

La hibridación intraespecífica espontánea es otra importante característica botánica observada en esta especie y otros miembros del género *Vasconcellea* (Kyndt *et al.*, 2006, p. 787, Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 54). De hecho, ciertos autores manifiestan que el babaco, cuyo nombre científico se reporta como *Vasconcellea x heilbornii* o *Carica pentagona*, es un híbrido natural producto del cruce entre las especies *V. stipulata* y *V. pubescens* (Siddiq *et al.*, 2012, p. 302; Duarte y Paull, 2015, p. 207). Esta distinguida cualidad permite la creación de nuevos híbridos de relevante envergadura, ofreciendo a su vez la oportunidad de incrementar la variabilidad genética del género (Morales, Medina y Yaguache, 2004, p. 13).

### **2.1.2 Distribución de *Vasconcellea pubescens***

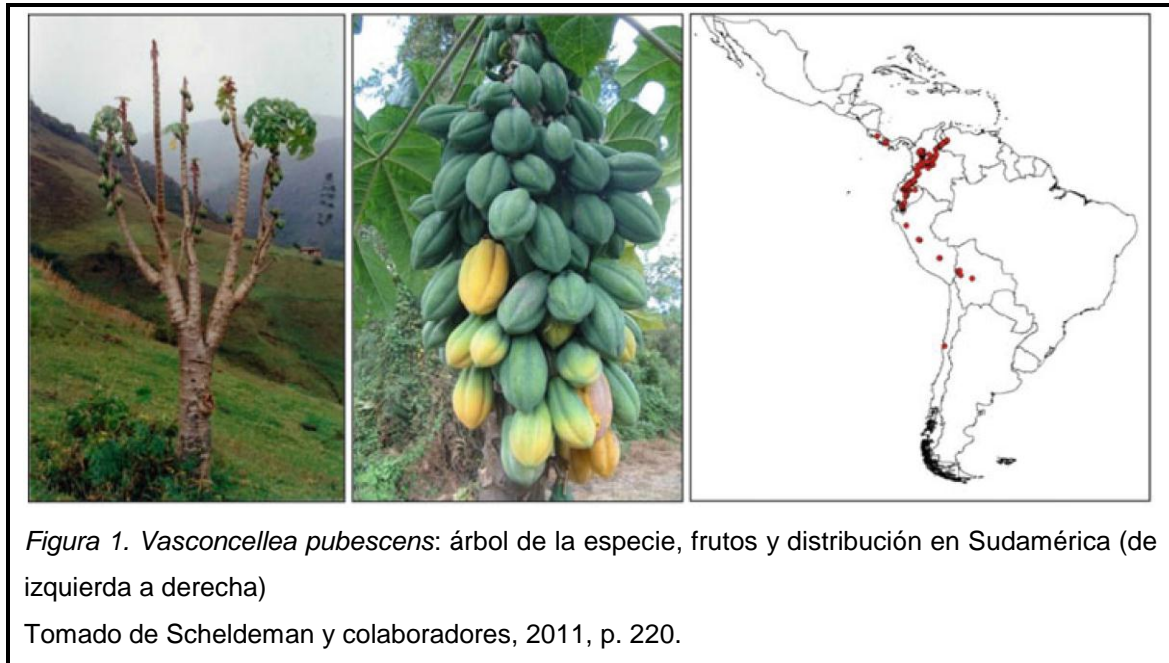
Las papayas de montaña pertenecientes al taxón *Vasconcellea* están distribuidas en Sudamérica al noroeste de la Cordillera de los Andes, encontrándose a altitudes que van desde los 750 hasta los 2500 metros sobre el nivel del mar (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 51). Scheldeman y colaboradores (2007, p. 1873) determinaron que de los 21 miembros que se reportan para el género *Vasconcellea*, 16 especies se concentran al sur del Ecuador, acuñándose por tanto a dicha nación como el

principal centro de diversidad del género, seguido por los países de Colombia y Perú que albergan a nueve de las especies frutales.

Las provincias de Loja, Zamora Chinchipe, Cañar, El Oro y Azuay, ubicadas al sur del territorio nacional del Ecuador, albergan la mayor parte de especies de *Vasconcellea* (INIAP, 2003, p. 2; Morales *et al.*, 2004, p. 5). Sin embargo, existe evidencia de un limitado número de miembros colectados en las provincias de Imbabura, Pichincha y Esmeraldas (norte del país) (Scheldeman *et al.*, 2007, p. 1876). Aunque existen ciertos miembros que se localizan a nivel del mar en climas prominentemente cálidos, la mayor parte de frutales de *Vasconcellea* tienen prioridad por los climas templados y fríos de los Andes, razón por la cual el designio del término colectivo “papayas de alta montaña o papayas de frío” estaría bien respaldado (Scheldeman *et al.*, 2007, pp. 1881-1882).

*V. pubescens* crece en distintas áreas sobre elevaciones de 1500 a 3000 metros de altura, abarcando zonas montañosas de climas secos, húmedos y ventosos, hasta bosques sombreados e incluso mesetas (Duarte y Paull, 2015, p. 202). El rango normal de temperatura en el que se desarrolla *V. pubescens* oscila entre 12 y 18°C o hasta 22°C, de allí que las zonas bajas del bosque montano constituyan uno de sus ambientes predilectos (Duarte y Paull, 2015, p. 203).

Esta especie se localiza en varios países, como: Panamá, Colombia, Perú, Venezuela, Bolivia, Ecuador, Chile y Costa Rica (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 214; Carvalho, 2015, p. 125). La factibilidad de aclimatación de este árbol frutal ha favorecido su adaptación en otros sectores como: India, Nueva Zelanda, Sri Lanka, Zambia y Puerto Rico (Coppens d’Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 51).



Típicamente esta especie frutal es referida con diversos calificativos dependiendo de las regiones en donde se localice. Así por ejemplo, en Ecuador, a los frutos de esta planta se les denomina chamburo, siglagón, toronche o gullán (INIAP, 2003, p. 26; Noriega *et al.*, 2014, p. 6); chilacuán o papayuela de altura en Colombia (Criollo *et al.*, 2004, p. 2); papayas de tierra fría, papayas chilenas o papayuelas en Chile (Vega-Gálvez *et al.*, 2007, p. 470; Vidal, Finot, Mora y Venegas, 2009, p. 94; Uribe *et al.*, 2015, p. 1); papaya de monte, huanarpu hembra y papaya arequipeña en las regiones de Perú y Bolivia (Duarte y Paull, 2015, p. 202); papayas de montaña o lechoso silvestre en Venezuela (Carvalho, 2015, p. 125).

Aparte de las numerosas terminologías, *V. pubescens* también muestra ciertas divergencias morfológicas ligadas a su lugar de origen; es así que tanto la forma, coloración y tamaño de los frutos colectados al sur de Ecuador difieren a los observados en Colombia y Venezuela (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 235). Tal característica puede surgir como resultado del alto grado de plasticidad fenotípica presenciado en esta especie y demás miembros del género *Vasconcellea* (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 54).

### 2.1.3 Producción y conservación de *V. pubescens*

*V. pubescens* se considera como un frutal silvestre subutilizado de la región de los Andes (Duarte y Paull, 2015, p. 202). En los altiplanos del estado colombiano los cultivos de esta especie se observan a nivel de jardines domésticos, huertos caseros, pequeñas parcelas y en su estado silvestre como árboles individuales en los bosques montañosos (Criollo *et al.*, 2004, p. 3; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 49). En cuanto a Ecuador, existe un cultivo primitivo de estos chamburos similar a lo presenciado en Colombia, encontrándose la mayor parte de esta especie en estado silvestre en las provincias de Loja, Azuay y Cañar, seguido por un limitado número de árboles localizados en los patios de ciertas comunidades y una escasa cantidad de huertos caseros que se dedican a la siembra de este frutal; a diferencia del babaco, que está establecido como un cultivo de notable importancia económica y cuyo fruto es muy apetecido por la localidad ecuatoriana y extranjera (INIAP, 2003, pp. 25-26, 37; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 228; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, pp. 49-50). En Venezuela y Perú se encuentran pequeños cultivares de *V. pubescens* a nivel de finca (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 49).

Esta especie fue introducidas con éxito en las regiones norte y sur-centro de Chile hace varias décadas (Vidal *et al.*, 2009, p. 2; Morales *et al.*, 2011, p. 635). Los cultivos frutales de esta especie forman parte de los ingresos de esta región, es así que sus plantaciones se utilizan para abastecer a la alimentación local y como producto de exportación hacia el continente de Europa y Estados Unidos (Scheldeman *et al.*, 2007, p. 1869; Carrasco *et al.*, 2009, pp. 331-332). Por tanto, Chile sería el único país en donde *V. pubescens* recibe una merecida importancia como cultivo comercial a diferencia de los otros estados andinos descritos previamente (Benítez *et al.*, 2013, p. 188). De hecho, alrededor de 225 hectáreas están destinadas al cultivo de papayuelas (Carrasco *et al.*, 2009, p. 332), en donde el principal método de propagación es por medio de semillas obtenidas de los frutos de flores femeninas (Duarte y Paull, 2015, p. 205). La información adquirida en Chile indica una producción anual de 15 a 30 toneladas por hectárea, siendo en promedio la vida útil de estos árboles de 5 a 8 años con un contenido entre 15 a 20 frutos por árbol cada mes (Duarte y Paull, 2015, p. 207).

Al igual que en Chile, *V. pubescens* se introdujo como especie comestible en Indonesia (Laily, Suranto y Sugiyarto, 2012, p. 16). Los cultivos de karika o papayas de meseta, terminologías locales de la especie, se ubican en la meseta de Dieng en la comunidad de Java Central (Rahayu, Habibah y Herlina, 2015, p. 23). Los frutos cosechados en esta región son muy apetecidos por la gente de la zona y por extranjeros (Permatasari, Sugiyarto, Marsusi y Hailu, 2015, p. 6). Sin embargo, pese a que existen plantaciones con fines comerciales, el nivel de producción es aún limitado (Permatasari *et al.*, 2015, p. 6).

La conservación *ex situ* tanto de *V. pubescens* como la de los demás miembros del taxón *Vasconcellea* es vital para asegurar la soberanía y prevalencia de la diversidad de estos frutales (Scheldeman *et al.*, 2011, pp. 225-226). En Ecuador, país que posee la mayor diversidad de papayas de montaña, las entidades encargadas de los bancos de germoplasma de estas especies son: el INIAP, el Jardín Botánico de Loja, la Universidad Técnica de Ambato y la Universidad Nacional de Loja (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 72). No obstante, no se tiene una colección de semillas de todas las especies y sumado a esto, existen reportes que muestran pérdidas de las colecciones obtenidas en campo (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 72). Asimismo hay una seria preocupación sobre el tiempo de viabilidad de las semillas que se almacenan en los bancos de germoplasma (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 226). Hasta la fecha, la vitrificación ha sido el único método aplicado con éxito en la especie *V. pubescens* (Ashmore, Drew y Azimi, 2007, pp. 541-542). Sin embargo, no se ha tenido logros inminentes al usar la criopreservación en ninguno de los miembros de *Vasconcellea* (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 226).

Por último, existe poca evidencia de conservación y propagación mediante el cultivo de tejidos (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 72). Uno de los pocos casos es el de Java Central, Indonesia, país donde Rahayu y colaboradores (2015, pp. 22-23) desarrollaron un medio para el cultivo *in vitro* de *V. pubescens* con el fin de conservar la especie y mejorar la producción de este frutal.

#### **2.1.4 Propiedades, aplicaciones e interés biotecnológico de la especie**

Las comunidades del callejón interandino utilizan los frutos maduros de las papayas de montaña para elaborar conservas, jugos, batidos, mermaladas, dulces, productos lácteos, helados, tostadas, e incluso se reporta su uso en salsas, cocteles, encurtidos y en rellenos para pasteles (INIAP, 2003, pp. 25-26; Scheldeman *et al.*, 2007, p. 1869; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 49). En ciertos lugares se cocina el fruto inmaduro del chamburo (*V. pubescens*) y se lo consume como vegetal (Duarte y Paull, 2015, p. 207). Las hojas de este frutal se usan para tratar golpes y dolores musculares (INIAP, 2003, p. 26).

Los frutos maduros de *V. pubescens* emanan una peculiar fragancia que resulta muy agradable para los consumidores locales y extranjeros (Balbontín *et al.*, 2013, p. 5114). Además, los mismos constituyen una invaluable fuente de proteínas, vitaminas, polisacáridos y carotenoides (Uribe, Delgadillo, Giovagnoli, Quispe y Zura, p. 1). Simirgiotis, Caligari y Schmeda (2009, p. 775) encontraron en su investigación compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes aislados de los frutos de *V. pubescens*.

El látex encontrado en los frutos inmaduros es quizá uno de los mayores recursos prometedores que otorga *V. pubescens* (Teixeira, Ribeiro, Gomes, Lopes y Salas, 2008, p. 956; Duarte y Paull, 2015, p. 207). Al respecto se ha reportado el uso directo de este látex en el tratamiento de verrugas y micosis cutánea (Schedelman *et al.*, 2011, p. 217). La papaina extraída a partir del látex de este frutal exhibe una actividad proteolítica que es 5 a 8 veces superior a la encontrada en el látex de *C. papaya*, despertando el interés de muchos científicos por esta proteína (Corrêa *et al.*, 2011, p. 1947; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 50). Particularmente, las enzimas proteolíticas aisladas de *V. pubescens* son empleadas en el ablandamiento de carnes (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 228; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 50).

Por otra parte, hay una serie de investigaciones en las que se demuestra la función de las proteasas de *V. pubescens* en el área médica y farmacéutica (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 51).

Entre dichos estudios se reportan: su aplicación como antiinflamatorio y diurético (INIAP, 2003, p. 26), sus capacidades curativas en úlceras gástricas (Mello *et al.*, 2008, pp. 237-238) y quemaduras de tercer grado (Gomes *et al.*, 2010, pp. 277-278), su acción mitogénica en fibroblastos y células epiteliales de mamíferos (Corrêa *et al.*, 2011, pp. 1947-1948), su función en dermoabrasiones (Lemos *et al.*, 2011, pp. 72-73), su posible uso como agente antitrombótico (Bilheiro *et al.*, 2013, pp. 175-176) y su rol como agente antitumoral (Dittz *et al.*, 2015, pp. 7028-7029, 7040).

En otro trabajo, Lemos y colaboradores (2016, pp. 94-95, 100) analizaron la correcta dosis farmacológica de cisteína proteasa, dando oportunidad a futuras aplicaciones de esta molécula como producto terapéutico. Asimismo, Torres y Obando (2016, pp. 1-4) mostraron que la papaina derivada de *V. pubescens* elimina por completo el biofilm producido por *Enterococcus faecalis*, una bacteria que produce enfermedades periodontales, caries y gingivitis, mostrando así el posible empleo de esta enzima en el área dental.

Otra notable característica presenciada en *V. pubescens* es su importante fuente de recursos genéticos, encontrándose al respecto: genes de tolerancia a temperaturas frías, genes de resistencia al virus de la mancha anular de papaya tipo P (PRSV-P por sus siglas en inglés) y genes de resistencia al punto negro causado por el hongo *Asperisporium caricae* (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, pp. 66-67). Estas cualidades moleculares hacen de esta especie una valiosa materia prima para el desarrollo de nuevas especies mediante programas de hibridación (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 236). Un claro ejemplo es el híbrido que se obtiene a partir del cruzamiento entre la papaya común y el chamburo *C. papaya* x *V. pubescens*, el cual muestra tolerancia al PRSV-P y al frío (Drew, Persley, O'Brien y Bateson, 2005, p. 103; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 237; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 67).

Sintetizando, la riqueza genética que ofrece *V. pubescens*, la diversidad de utilidades descritas para sus enzimas proteolíticas y otros metabolitos, sumadas a la posibilidad de desarrollar nuevos individuos dotados de las mejores



características agrícolas, hacen de este frutal un potente recurso biológico (Schedelman *et al.*, 2011, pp. 236-237).

## **2.2 Estrés térmico**

### **2.2.1 Generalidades y definición del estrés térmico**

El estrés térmico se define como el incremento calórico, por un periodo e intensidad suficiente, que sea capaz de ocasionar efectos adversos irreversibles sobre las funciones biológicas de la planta, afectando su desarrollo vegetativo y reproductivo (Essemine *et al.*, 2010, p. 566; Lipiec, Doussan, Nosalewicz y Kondracka, 2013, p. 463). La masiva producción de CO<sub>2</sub> y otros gases de efecto invernadero, sumados al calentamiento global, las intensas olas de calor y el déficit hídrico potencian la generación del estrés por calor en las plantas (Lipiec *et al.*, 2013b, p. 464; Asthir, 2015, p. 202). Este tipo de estrés puede manifestarse por medio de un aumento térmico proveniente del suelo o del aire; además, el incremento de temperatura puede suscitarse tanto en el día como en la noche (Trivedi, 2015, p. 151).

### **2.2.2 Impacto del estrés térmico sobre la fisiología y anatomía vegetal**

Las plantas sujetas a un estrés térmico exhiben daños severos a nivel molecular, celular y fisiológico (Essemine *et al.*, 2010, p. 566). El modo de acción que tenga el estrés calórico será en función de la especie vegetal, su estado de desarrollo y también del genotipo (Bita y Gerats, 2013, p. 2). Numerosas lesiones en la anatomía de las plantas se presentan como consecuencia de las elevadas temperaturas, entre las cuales se encuentran: quemaduras y abrasiones sobre la superficie de tallo, ramas y hojas, senescencia de tejidos, abscisión foliar y significativos daños a nivel de fruto y semillas (Bita y Gerats, 2013, p. 2; Hasanuzzaman, Nahar, Alam, Roychowdhury y Fujita, 2013b, p. 9647; Trivedi, 2015, p. 152).

Todas las fases del ciclo biológico de las plantas son propensas al estrés calórico (Prasad y Staggenborg, 2008, p. 308). No obstante, el daño infligido por este estrés varía respecto al estado de crecimiento en que se encuentre la planta

(Trivedi, 2015, p. 152). Así por ejemplo, las semillas expuestas al estrés por calor pueden presentar diversos síntomas, como son: un bajo porcentaje de germinación, una reducida emergencia de las plántulas, un decrecimiento en el tamaño y número de raíces, o en el peor de los casos, una inhibición en el crecimiento de raíz y brotes (Prasad y Staggenborg, 2008, p. 311; Bitá y Gerats, 2013, p. 5). Afectaciones en el área foliar, un limitado crecimiento del tallo, una reducción en el peso de la planta y un bajo rendimiento de la biomasa son otras anomalías provocadas por las altas temperaturas durante el desarrollo vegetativo (Wahid, Farooq, Hussain, Rasheed y Galani, 2012, pp. 137-138; Hasanuzzaman *et al.*, 2013a, p. 172).

Durante el periodo de floración, el estrés térmico puede reducir el número de los granos de polen, inhibir su desarrollo o afectar su viabilidad causando esterilidad y reduciendo la formación de granos y frutos (Prasad y Staggenborg, 2008, pp. 312, 319; Qu, Ding, Jiang y Zhu, 2013, p. 203). Las excesivas temperaturas también pueden causar un deterioro en las anteras, reducir la viabilidad de los óvulos, afectar la emergencia de los pistilos y en el peor de los escenarios, pueden restringir la transición a la floración, provocar una abscisión, un aborto floral o la necrosis de esta estructura (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, pp. 9648-9649; Trivedi, 2015, p. 154).

La productividad y rendimiento también se ven limitados debido a que el estrés térmico acelera el desarrollo normal de los cultivos y reduce la fotosíntesis acortando la temporada de cosecha, lo cual termina afectando la maduración, el peso, tamaño, forma y calidad nutricional de granos y frutos (Prasad y Staggenborg, 2008, p. 312; Essemine *et al.*, 2010, p. 566; Lipiec *et al.*, 2013, pp. 470-471). En el caso de cereales y leguminosas se reporta una notable reducción en el contenido de almidón, aceite, proteína y vitaminas; mientras que los frutos exhiben una decoloración y aberraciones en su formación (Prasad y Staggenborg, 2008, pp. 323-324; Bitá y Gerats, 2013, p. 5; Trivedi, 2015, p. 153).

Dentro de los procesos celulares, la fotosíntesis es una de las reacciones biológicas que mayor grado de lesiones exhibe ante los eventos de estrés térmico (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9648). Es así que cuando la

temperatura sobrepasa el rango normal de crecimiento, las estructuras de los fotosistemas I y II, ubicados en las membranas de los tilacoides, son gravemente dañados; además, el contenido de clorofila decrece y la actividad enzimática de la Rubisco decae considerablemente afectando el ciclo de Calvin (Wahid *et al.*, 2012, p. 140; Bitá y Gerats, 2013, p. 3; Trivedi, 2015, p. 155). Esta serie de implicaciones disminuyen la actividad fotosintética, mientras que la fotorespiración celular incrementa (Hasanuzzaman *et al.*, 2013a, p. 174; Trivedi, 2015, pp. 155-156).

Otro de los efectos negativos ligados al estrés calórico es la pérdida acelerada de agua en los cultivos (Hasanuzzaman *et al.*, 2013a, p. 175; Trivedi, 2015, pp. 152, 155). Ante esta condición adversa la planta cierra sus estomas, incrementa la tasa de evapotranspiración y reduce el potencial osmótico de las hojas, lo que termina produciendo una deshidratación de los tejidos y la inducción de un estrés osmótico e hídrico (Prasad y Staggenborg, 2008, p. 327; Wahid *et al.*, 2012, p. 141).

A nivel bioquímico, el choque térmico conduce a un desbalance metabólico provocando un incremento en la fluidez de la membrana, daños en las estructuras proteicas, alteraciones en los niveles de expresión, inhibición catalítica de enzimas, reducción en la síntesis de ciertas proteínas y modificaciones negativas en las rutas metabólicas (Bitá y Gerats, 2013, p. 3; Lipiec *et al.*, 2013, p. 468; Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, pp. 9645-9646). Otra de las consecuencias derivadas por efectos del estrés calórico es la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno, las cuales desencadenan un estrés oxidativo sobre las biomoléculas y otros metabolitos (Essemine *et al.*, 2010, p. 569; Asthir, 2015, pp. 202-203).

### **2.2.3 Mecanismos de respuesta y defensa utilizados por las plantas**

Las plantas han desarrollado un arsenal de mecanismos con el fin de hacer frente al estrés calórico (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9654). Estas respuestas adaptativas no solo dependen de la duración, intensidad y la tasa de aumento

de la temperatura, sino también de la especie, variedad vegetal e incluso del genotipo (Hasanuzzaman *et al.*, 2013a, p. 169; Lipiec *et al.*, 2013, p. 463).

En general, las plantas para lidiar con los aumentos de temperatura reprograman su genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma (Bita y Gerats, 2013, p. 7). Tres tipos de adaptaciones se manifiestan en las plantas: morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Trivedi, 2015, p. 152). Como primera estrategia, las plantas reducen el tamaño y división de sus células, aumentan la densidad de sus tricomas y estomas, acortan al máximo la pérdida de agua y alargan los vasos del xilema tanto en el tallo como en la raíz (Hasanuzzaman *et al.*, 2013a, p. 172; Trivedi, 2015, p. 152).

Otra característica adaptativa es la expresión de genes responsivos al calor y la síntesis de ciertos metabolitos primarios y secundarios (Wahid *et al.*, 2012, p. 142). Entre los metabolitos primarios se encuentran los osmolitos o también denominados solutos compatibles, los cuales ayudan a estabilizar la homeostasis celular y controlan el ajuste osmótico durante los periodos de estrés térmico (Wahid *et al.*, 2012, pp. 141-142; Bita y Gerats, 2013, p. 7). De igual manera, los metabolitos secundarios, entre los que se incluyen: flavonoides, fenoles, antocianinas, esteroides y carotenos, confieren termo tolerancia a las plantas y regulan la síntesis de otras moléculas que responden al estrés calórico (Bita y Gerats, 2013, p. 3; Trivedi, 2015, p. 156). Existen otras respuestas bioquímicas vinculadas con la resistencia al calor, tales como: la acumulación de enzimas detoxificantes, moléculas antioxidantes, moléculas transportadoras de iones, factores involucrados en rutas de señalización y la síntesis de fitohormonas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9644; Asthir, 2015, pp. 203-294).

A nivel molecular, una de las mayores estrategias evolutivas usadas por las plantas es la sobreexpresión de genes codificantes de las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés de *Heat Shock Proteins*) (Bita y Gerats, 2013, p. 8). Estas proteínas son quizá, uno de los principales factores en promover una respuesta adaptativa al incremento de temperatura (Bita y Gerats, 2013, p. 9; Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, pp. 9662-9663). Al actuar como chaperonas, estas moléculas evitan la degradación y agregación de otras proteínas, regulan el plegamiento de polipéptidos y brindan protección a otras

estructuras celulares, permitiéndole a las plantas sobrellevar los efectos del estrés térmico (Wahid *et al.*, 2012, pp. 143-144; Asthir, 2015, p. 206; Trivedi, 2015, p. 157).

Los cambios mediados en la estructura de la cromatina y los nucleosomas también participan en la regulación de genes responsivos al estrés térmico (Bita y Gerats, 2013, p. 4); concretamente, las modificaciones y variantes de histonas (histona H2A.Z) están estrechamente relacionados con el control de la expresión de genes bajo condiciones de calor (Pecinka y Scheid, 2012, pp. 801-802).

Sintetizando, la supervivencia de la planta dependerá de su habilidad de percibir los estímulos provocados por el estrés térmico y la rapidez con la que se efectúe la mejor respuesta (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9643). Sin embargo, si el estrés es muy severo o demasiado prolongado, la muerte celular puede darse en tan solo minutos resultando en un colapso y muerte súbita de la planta (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9645).

#### **2.2.4 Formación de estrés oxidativo**

La producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus abreviaturas en inglés de *Reactive Oxygen Species*) constituye un mecanismo natural derivado a partir del metabolismo aerobio suscitado en los cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias de la célula vegetal (Labudda, 2013, p. 2; Hossain *et al.*, 2015, pp. 1-2). En condiciones normales, menos del 10% de los ROS se liberan como resultado de la reducción del oxígeno molecular a través de la cadena transportadora de electrones, siendo luego eliminados por sistemas detoxificantes (Lushchak, 2014a, p. 165). No obstante, el incremento de temperatura, entre otros diferentes tipos de estrés, potencian la producción de las especies reactivas de oxígeno causando un estrés oxidativo en las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013, p. 9644).

El estrés oxidativo es un estado de desbalance en la señalización redox y la homeostasis celular que se genera por una acumulación excesiva de las especies reactivas de oxígeno y una inhibición o reducción en la actividad bioquímica de los sistemas enzimáticos antioxidantes (Poljsak, Šuput y Milisav,

2013, p. 1; Lushchak, Stefanyk, National y Stefanyk, 2014b, p. 928). Entre los ROS se encuentran: radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), catalogados colectivamente con el nombre de radicales libres, así como también el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), (Poljsak *et al.*, 2013, p. 1). Estos ROS reaccionan de forma rápida con los lípidos, proteínas, carbohidratos e incluso ácidos nucleicos provocando un súbito daño oxidativo sobre estas moléculas y por consiguiente, alteraciones en numerosos procesos celulares (Lushchak *et al.*, 2014b, p. 927; Schieber y Chandel, 2014, pp. 453-454; Lichtenberg y Pinchuk, 2015, pp. 1-3). Como consecuencia de los procesos oxidativos se generan modificaciones estructurales en dichas biomoléculas, razón por la cual, estas moléculas constituyen importantes marcadores biológicos del estrés oxidativo (Shulaev y Oliver, 2006, p. 367; Lushchak *et al.*, 2014b, p. 927).

Entre los principales síntomas producidos por el estrés oxidativo en las plantas están la destrucción de los pigmentos fotosintéticos y una peroxidación en los lípidos de membrana (Wahid *et al.*, 2012, p. 141; Bitá y Gerats, 2013, pp. 3-4), lo que a su vez desencadena en diversas anomalías, como son: un blanqueamiento en las hojas, restricción en el crecimiento vegetal, inhibición de la reproducción y senescencia en los tejidos (Noctor, Lelarge-Trouverie y Mhamdi, 2014, p. 3).

Con el fin de mitigar los estragos del estrés oxidativo, la planta detiene todos sus procesos biológicos, para con ello, centrarse en bloquear el daño ejercido por los ROS (Lushchak, 2014a, p. 167). Este mecanismo de respuesta dependerá del metabolito afectado, la localización sub-celular y la naturaleza química de las especies reactivas de oxígeno (Noctor *et al.*, 2014, p. 2). Así por ejemplo, las proteínas oxidadas se eliminan de la célula vegetal por medio de proteasas, los ácidos nucleicos afectados son reparados mediante enzimas especializadas, mientras que las acil-transferasas, peroxidasas y fosfolipasas se encargan de los lípidos oxidados (Poljsak *et al.*, 2013, p. 2).

Adicional a estos mecanismos, las plantas promueven la sobreexpresión de enzimas especializadas, tales como: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa, glutatión sulfuro

transferasa y otras moléculas antioxidantes: carotenoides, antocianinas, ácido úrico, glutatión y ácido ascórbico e incluso la síntesis de ciertas fitohormonas; estos compuestos tienen el propósito de eliminar o prevenir la acumulación de las especies reactivas de oxígeno (Poljsak *et al.*, 2013, pp. 2-3; Noctor *et al.*, 2014, pp. 6, 12; Lushchak *et al.*, 2014b, pp. 925-926). Sin embargo, si los niveles de concentración de las especies reactivas de oxígeno son muy elevados, la planta no puede combatir los efectos del daño oxidativo produciéndose una disfunción metabólica que termina en una apoptosis celular y muerte del organismo (Hasanuzzaman *et al.*, 2013, pp. 9651-9652; Hossain *et al.*, 2015, p. 2).

#### **2.2.4.1 Carbonilación de proteínas**

El estrés oxidativo ocasiona modificaciones post-traduccionales que afectan la estructura de las proteínas (Tamarit *et al.*, 2012, p. 3778). El resultado de esas modificaciones es la carbonilación proteica, que consiste en la incorporación de grupos carbonilo sobre las cadenas laterales de los aminoácidos (Garzón *et al.*, 2012, p. 297).

El daño oxidativo en las proteínas se manifiesta mediante una oxidación directa provocada por las especies reactivas de oxígeno sobre ciertos aminoácidos: lisina, arginina, prolina, treonina, asparragina y glutamina (Yan y Forster, 2011, p. 2; Baraibar, Ladouce y Friguet, 2013, p. 5). La carbonilación de proteínas también puede ocurrir de forma indirecta: ya sea a través de la interacción de las proteínas con los productos derivados de la peroxidación de lípidos, o mediante la unión covalente de los aminoácidos con azúcares oxidados (glucosa y fructosa), dando cabida a una lipoxidación y glicación, respectivamente (Tamarit *et al.*, 2012, p. 3778; Aldini *et al.*, 2015, p. 254). Todas estas reacciones no enzimáticas ocurren de forma simultánea durante los eventos de estrés oxidativo y son irreversibles (Madian y Regnier, 2010, pp. 3766-3767; Garzón *et al.*, 2012, p. 297).

Una proteína oxidada sufre diversos cambios conformacionales que conllevan a un mal plegamiento y a una eventual pérdida de su función biológica (Baraibar *et al.*, 2013, pp. 3-6). Asimismo, la adición de grupos carbonilo decrece la

actividad catalítica de las enzimas, altera las interacciones con otros receptores, causa un deterioro estructural en las proteínas transportadoras de membrana y promueve una agregación anormal (Garzón *et al.*, 2012, p. 297). Ante estos acontecimientos la célula sintetiza nuevas proteínas y recurre a sistemas proteolíticos con el fin de destruir las proteínas oxidadas (Acosta y Hernández, 2006, p. 38).

Las proteínas carboniladas se usan como un método directo para detectar y monitorear los niveles de oxidación proteica (Acosta y Hernández, 2006, p. 38; Baraibar *et al.*, 2013, p. 7). Entre los numerosos ensayos analíticos, la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH por sus siglas en inglés) constituye uno de los principales reactivos empleados en la cuantificación del daño oxidativo provocado en las proteínas (Yan y Forster, 2011, p. 1309; Garzón *et al.*, 2012, p. 297). Este reactivo reacciona covalentemente con los grupos carbonilo presentes en las proteínas oxidadas formando un compuesto orgánico estable denominado 2,4- dinitrofenilhidrazona (DNP por sus siglas en inglés) (Baraibar *et al.*, 2013, p. 8). Al producirse la respectiva hidrazona se forma un precipitado de coloración naranja que es medible por espectrofotometría a una longitud de onda entre 365 a 375 nanómetros (Baraibar *et al.*, 2013, p. 8). Los grupos carbonilos también pueden cuantificarse mediante ensayos de inmunodetección (western blot, dot blot y ELISA) usando anticuerpos comerciales que reconocen y se unen a las hidrazonas previamente formadas (Yan y Forster, 2011, pp. 1309-1310; Tamarit *et al.*, 2012, p. 3778; Baraibar *et al.*, 2013, pp. 8-9).

#### **2.2.4.2 Oxidación de lípidos**

Los lípidos constituyen uno de los principales componentes moleculares propensos a daños provocados por el estrés oxidativo (Labudda, 2013, p. 2). Al incrementarse los niveles de los ROS aumenta la oxidación de los lípidos (Labudda, 2013, p. 3; Singh, Kapoor y Bhatnagar, 2015, pp. 1-2). La peroxidación de lípidos se define como un mecanismo de oxidación biológica, en donde los radicales libres, principalmente los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) e hidroperoxilo ( $\text{HO}^{\cdot}_2$ ) atacan a las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados (Ayala, Muñoz y Arguelles, 2014, p. 1; Noctor *et al.*, 2014, p. 5). El citocromo P450 y las enzimas



lipoxigenasas y ciclooxigenasas también están implicados en la oxidación lipídica (Ayala *et al.*, 2014, p. 2).

Como consecuencia de la degradación oxidativa se forman radicales de lípidos y otros compuestos que dañan y desestabilizan las membranas biológicas; además, se manifiestan cambios en las propiedades biofísicas tanto de lípidos como de proteínas asociadas a lípidos, inactivación enzimática y otros efectos que alteran la función celular (Repetto, Semprine y Boveris, 2012, pp. 3, 10-11). Dichos sucesos en el peor de los escenarios conllevan a una muerte celular (Ayala *et al.*, 2014, p. 2).

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que se desarrolla en tres pasos bien definidos: iniciación, propagación y terminación (Dukić *et al.*, 2012, p. 193). En este proceso se forman los hidroperóxidos lipídicos, que son los principales compuestos de la oxidación primaria (Ayala *et al.*, 2014, p. 3). Estos compuestos primarios se descomponen dando lugar a una serie de componentes secundarios, considerados como los productos finales de la peroxidación lipídica, entre los que constan: alcoholes, hidrocarburos, cetonas, ácidos orgánicos volátiles y aldehídos, muchos de los cuales resultan altamente dañinos para la célula (Shahidi y Zhong, 2005, p. 366; Dukić *et al.*, 2012, p. 193).

Uno de los productos secundarios más utilizados como marcador de estrés oxidativo es el Malondialdehído (MDA) (Noctor *et al.*, 2014, p. 4; Singh *et al.*, 2015, p. 3), el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) produciendo un cromógeno fluorescente de coloración roja-rosada, que puede ser cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 532 nanómetros (Dukić *et al.*, 2012, p. 198; Repetto *et al.*, 2012, pp 20-21).

### **2.2.5 Impacto del estrés térmico en los alimentos y la economía**

Las altas temperaturas tienen efectos nocivos sobre la producción y el rendimiento de los cultivos, e incluso pueden provocar la extinción de importantes especies agrícolas (Abdallah, Moses y Prakash, 2014, p. 78; Hatfield y Prueger, 2015, pp. 4, 6). De 1980 al 2008 la producción mundial de trigo y maíz tuvieron un descenso de 5.5 y 3.8%, respectivamente, como resultado de las

fluctuaciones de temperatura (Lobell, Schlenker y Roberts, 2011, pp. 617-618). Así también, los fuertes episodios de calor del 2003 ocasionaron una pérdida cuantiosa de 5.18 millones de toneladas de arroz en China (Jha, Bohra y Singh, 2014, p. 680). Similares pérdidas se reportan en diferentes cultivos de granos en los Estados Unidos, África y Asia (Wahid *et al.*, 2012, p.136; Jha *et al.*, 2014, p. 680). Este bajo rendimiento de los cultivos perjudica la economía del sector agrícola (Abdallah *et al.*, 2014, pp. 77-78), principalmente para aquellos países en vías de desarrollo, donde cerca del 50% de la población depende del expendio de sus cultivos (Bita y Gerats, 2013, p. 1).

Los fuertes episodios de calor también traen consigo un catastrófico descenso en la cantidad y calidad nutricional de los alimentos, agravando el cuadro de desnutrición en la población (Chhetri y Chaudhary, 2011, p. 487; Jha, Bohra y Singh, 2014, p. 680). Es así que el Grupo Intergubernamental del Cambio Climático (IPPC por sus siglas en inglés de *Intergovernmental Panel on Climate Change*), en su cuarto informe, califica al estrés térmico como una potencial amenaza para la seguridad alimentaria en todo el mundo (IPCC, 2007, pp 8-9).

La actividad agrícola enfrenta actualmente serios daños como resultado del estrés térmico (Abdallah *et al.*, 2014, p. 77). Sin embargo, de acuerdo a los datos estadísticos, las intensas olas de calor que están por venir serán aún más severas (Hatfield y Prueger, 2015, p. 4). Durante las estaciones de verano, para el año 2090, se pronostica un incremento de 3.7 hasta 9.8°C respecto al rango de temperatura promedio (Battisti y Naylor, 2009, p. 241). En otra investigación, se menciona que por cada 1°C que incremente la temperatura habrá un descenso del 0.6 al 8.9% en la producción total de los seis principales cultivos: arroz, trigo, soya, cebada, maíz y sorgo (Liu, Feng, Li y He, 2015, p. 2). Otros modelos estadísticos muestran incrementos de 2.5 a 5.4°C para el 2100 y un 15% de reducción en la precipitación (Lipiec *et al.*, 2013, p. 464), lo cual sin duda tendrá efectos adversos sobre el rendimiento y la economía de los cereales más importantes (maíz, arroz y trigo) (Jha *et al.*, 2014, p. 680).

A finales del siglo 21, las zonas tropicales y subtropicales experimentarán un severo incremento en las temperaturas estacionales, incluso se reporta que las

olas de calor superarán con creces a las temperaturas extremas registradas durante el siglo pasado (Battisti y Naylor, 2009, pp. 240-241). Este hecho repercutirá en la economía de los más de 3 billones de habitantes de esas áreas, cuyo sustento de vida depende netamente de los productos agrícolas tropicales (Battisti y Naylor, 2009, pp. 240-241). Asimismo, según otros análisis, el calentamiento global reducirá en un 10% la producción de los cultivos, elevando la escasez de alimentos y las tasas de desnutrición; por tal motivo, entre los años 2010-2050 se prevé que la cantidad de comida debe incrementarse en un 50%, para así suplir las necesidades alimenticias de una población en constante crecimiento (Tai, Martin y Heald, 2014, p. 1).

Otra de las consecuencias impartidas por el excesivo calor es la desecación de los suelos y un estrés hídrico sobre los cultivos, haciendo necesario el uso de mayores cantidades de agua para solventar este problema (Wahid *et al.*, 2012, p. 141; Hendricks y Peterson, 2014, p. 1). En las áreas del medio oeste de los Estados Unidos, Hendricks y Peterson (2014, p. 20) estimaron que un aumento de 2°C en la temperatura puede ocasionar aridez en los cultivos, lo que se reflejaría en pérdidas anuales estimadas en 8.76 billones de dólares.

En un futuro, las cuantiosas pérdidas en los cultivos de cereales, frutas tropicales y viñedos inducirán una alta demanda de alimentos provocando un alza de precios sobre los productos de consumo primario, lo cual desestabilizará los valores mundiales establecidos para los productos agrícolas (Battisti y Naylor, 2009, pp. 243-244). De hecho, este suceso ya se evidenció en el 2010 en Rusia, donde los incrementos de temperatura afectaron en un 20% a la producción de trigo, conllevando a un aumento del precio de este producto por arriba del 50% (Teixeira, Fischer, Velthuisen, Walter y Ewert, 2013, p. 206).

Todas estas cifras se traducen en alarmantes escenarios que pondrán en juego la vida de la población mundial. Por esta razón, es necesaria la identificación de factores moleculares vinculados con la respuesta al estrés térmico en plantas, con el propósito de producir cultivos capaces de crecer bajo condiciones severas de temperatura y que además, puedan abastecer a toda la población (Abdallah *et al.*, 2014, pp. 78-79).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Material vegetal

##### 3.1.1 Desinfección de semillas de *V. pubescens*

Para el presente trabajo de titulación se utilizaron semillas botánicas extraídas de frutos maduros de *Vasconcellea pubescens*. Los frutos fueron colectados en la provincia de Imbabura, cantón San Miguel de Urcuquí en el barrio San Ignacio latitud norte 0° 25' 13" oeste 78° 11' 50" y donados por Gisella Landázuri, estudiante egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la UDLA.

Los frutos se desinfectaron por inmersión en una disolución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos y se procedió a extraer las semillas en una cámara laminar ESCO Opti MAIR de flujo horizontal. El mucílago que recubría las semillas se retiró cuidadosamente con la ayuda de pinzas estériles. A continuación, se trató las semillas con 50 mL de etanol al 96% e hipoclorito de sodio al 10% (50 mL) por tiempos de tres y diez minutos respectivamente, de acuerdo por lo descrito por Cai *et al.*, (1999, pp. 62-64). Por último, para remover el cloro y alcohol presentes en la superficie de las semillas, se realizó tres lavados con agua destilada por un minuto. Las semillas se almacenaron en tubos para centrífuga de 50 mL hasta su posterior siembra.

##### 3.1.2 Siembra de semillas de *V. pubescens*

La siembra de semillas de *V. pubescens* se realizó en ~45 g de tierra estéril marca MultiFlor – Tierra tipo 1, dentro de vasos plásticos de poliestireno de 8.5 cm de alto, 4.5 cm de diámetro inferior y 7.5 cm de diámetro superior. Las semillas se introdujeron en el sustrato con una pinza a una profundidad de ~2 cm desde la base superior del vaso. Para los ensayos de estrés térmico directo y estrés térmico gradual se sembró cinco y dos semillas por cada vaso, respectivamente. Cada 72 horas las semillas se irrigaron con ~30 mL de agua destilada y cada 120 horas (5 días) con una solución de fertilizante orgánico al 0.12 % marca FORZA-Desarrollo. Los vasos que contenían las respectivas semillas se colocaron en repisas de aluminio y se los dejó a temperatura ambiente (~ 25°C) y fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Para realizar los respectivos ensayos de estrés por incremento directo y gradual de temperatura se sembró un total de 196 semillas de *V. pubescens*. En base a ese número de semillas se determinó la energía acumulativa, referida en función del porcentaje de germinación en el tiempo.

### **3.2 Inducción de estrés por incremento de temperatura**

#### **3.2.1 Estrés térmico directo**

Las plántulas germinadas se dejaron crecer hasta que se observó la aparición de al menos 4 hojas verdaderas por planta. Para el ensayo de inducción de estrés directo de temperatura se utilizaron 12 vasos con 5 plántulas de *V. pubescens* por vaso, con un total de 60 plántulas. Las plántulas de ~75 días, presentaron composición morfológica (tamaño y número de hojas) homogénea. El factor en estudio fue la temperatura con tres niveles del factor (25, 33.5 y 45 °C) (Anexo 1). Las variables en estudio fueron contenido de carbonilos, concentración de proteína, concentración de sólidos solubles totales, contenido de carbonilos, concentración de malondialdehído (MDA) y expresión de genes homólogos a *H2A.Z*). Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento.

La inducción de las plántulas a las temperaturas de 33.5 y 45°C se realizó al mismo tiempo en dos incubadoras 311DS Environmental Shaking Incubator marca Labnet International, Inc.

Concluido el ensayo de estrés, se cortó las hojas verdaderas de las plántulas de cada vaso y se las congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Finalmente, se almacenó todas las muestras en un ultracongelador VWR modelo 5708 a una temperatura de -80°C hasta su posterior uso en los ensayos bioquímicos.

#### **3.2.2 Estrés térmico gradual**

Con el propósito de contrastar los datos del ensayo de estrés térmico directo, se optó por realizar una inducción de estrés térmico de forma gradual o progresiva. Para lo cual, se utilizaron 16 vasos con 2 plántulas de *V. pubescens* por vaso, con un total de 48 plántulas. Las plántulas presentaron composición morfológica similar a las del ensayo anterior. El factor en estudio fue el régimen de calentamiento con cuatro niveles del factor (25°C/168 h, 33.5°C/12 h, 45°C/12 h

y recuperación/72 h) (Anexo 2). Las variables en estudio fueron contenido de carbonilos (menciona las cosas bioquímicas que mediste) y expresión de genes homólogos a H2A.Z). Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento.

Las plántulas sometidas al estrés se introdujeron en una incubadora 311DS Environmental Shaking Incubator marca Labnet International, Inc. y se incrementó de forma gradual la temperatura cada 12 horas, empezando desde 27.5°C hasta la temperatura final de 45°C.

Al término de cada tratamiento térmico y previo a aumentar el siguiente nivel de temperatura, las plántulas se irrigaron con ~30 mL de agua destilada, con el propósito de evitar una deshidratación excesiva. Además, con el fin de evaluar si existía un cambio a nivel fenotípico, molecular o bioquímico se decidió realizar un ensayo de recuperación, en donde las plántulas previamente sometidas a una temperatura de 45°C se las dejó en recuperación a temperatura ambiente por 72 horas.

Una vez que finalizó la inducción gradual de las plántulas a las respectivas temperaturas seleccionadas (temperatura ambiente, 33.5°C, 45°C y recuperación), se extrajo las hojas verdaderas de las plántulas de cada vaso y se las congeló en nitrógeno líquido. Finalmente, se almacenó todas las muestras en un ultracongelador VWR modelo 5708 a una temperatura de – 80°C hasta su posterior uso en los ensayos moleculares y bioquímicos.

### **3.3 Ensayos bioquímicos**

#### **3.3.1 Procesamiento de las muestras foliares**

Para el procesamiento de tejido vegetal se pesó en una balanza analítica BOECO modelo BBI31 ~250 mg de muestra foliar correspondiente a cada tratamiento térmico, tanto del estrés térmico directo como del estrés gradual. Las respectivas muestras se colocaron en tubos microcentrífuga de 1.5 mL, seguido de la adición de 250 µL de una solución de inhibidor de proteasas 5X. La solución de inhibidor de proteasas se preparó disolviendo 1/4 de pastilla de inhibidor *SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet* de Sigma-Aldrich en 2.5 mL de Tampón fosfato salino 1X (PBS, por sus siglas en inglés). Luego, con ayuda de

un pistilo estéril se procedió a macerar cada muestra hasta que, en lo posible, no se observaran restos sólidos.

Las muestras maceradas se centrifugaron a una temperatura de 4°C por 30 minutos y a 14000 rpm (revoluciones por minuto) en el equipo Centrifuge 5804 R marca Eppendorf. El extracto obtenido se separó del pellet, se midió su volumen y se lo transfirió a nuevos tubos para microcentrífuga de 1.5 mL. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en un ultracongelador horizontal VWR modelo 5708 a una temperatura de -80°C hasta su posterior uso.

### **3.3.2 Determinación de la concentración proteica por medio del ácido bicinconínico (BCA)**

La concentración proteica de las muestras se cuantificó por medio del ácido bicinconínico, para lo cual se utilizó el kit *QuantiPro™ High Sensitivity Protein Assay* de la empresa Sigma-Aldrich. El reactivo del ácido bicinconínico se preparó de acuerdo al número de muestras, a partir de los siguientes componentes: 250 mL de *QuantiPro Buffer QA*, 250 mL de *QuantiPro BCA QB* y 12 mL de sulfato de cobre pentahidratado que venían en el kit.

Paralelo a la preparación del BCA, se procedió a diluir las muestras obtenidas en la sección 3.4.1 anteriormente descrita. Los sobrenadantes de cada una de las muestras se diluyeron en tampón fosfato salino 1X en proporción 1:20 (muestra/tampón). La dilución se preparó en tubos de 0.7 mL y de esta solución se tomó un volumen de 5  $\mu$ L que se colocó por triplicado sobre los 200  $\mu$ L del ácido bicinconínico, que se habían añadido previamente en una microplaca CORNING COSTAR de 96 pocillos.

La solución proteica de albúmina de suero bovino (BSA) se usó como estándar para la elaboración de la curva de calibrado. Para ello, en la misma microplaca que contenía los 200  $\mu$ L de BCA, se procedió a colocar por triplicado un contenido desde 0 a 10  $\mu$ g de este estándar cuya concentración era 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

La microplaca que contenía el estándar BSA y las distintas muestras se colocó dentro de una incubadora 311DS Environmental Shaking Incubator marca Labnet International, Inc. y se dejó en incubación por 30 minutos a 37°C.

Terminado este tiempo, se midió las absorbancias mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 562 nanómetros, utilizando el lector de placa multimodal FLUOstar Omega de la compañía BMG LABTECH. La concentración de proteína soluble de las muestras se determinó a partir de la ecuación de la curva de calibrado del BSA.

### **3.3.3 Medición del contenido de sólidos solubles totales**

La cuantificación de los sólidos solubles totales se efectuó por gravimetría. En primer lugar, se procedió a realizar 3 recipientes de aluminio por cada muestra. Estos recipientes se introdujeron en una incubadora 311DS Environmental Shaking Incubator marca Labnet International, Inc. y se sometieron a un proceso de secado por 24 horas a una temperatura de 60°C. Transcurrido dicho tiempo, se pesó 3 veces cada recipiente en una balanza analítica BOECO modelo BBI-31 y se verificó que los pesos fueran constantes. Una vez cumplidas tales condiciones, se añadió en cada recipiente un volumen de 10 a 30 µL de extracto soluble que correspondía a cada tratamiento térmico. Con la ayuda de una pinza, se tomó con cuidado cada recipiente y se los introdujo nuevamente en la incubadora bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Cumplido el tiempo de deshidratación, se pesó cada recipiente por triplicado verificando una vez más que los pesos fueran constantes.

El peso neto del extracto seco se calculó mediante la diferencia entre el peso del recipiente que contenía el sobrenadante deshidratado respecto del peso del recipiente vacío. Finalmente, con este dato y considerando el volumen y peso total de muestra procesada, se determinó el contenido de sólidos solubles totales por gramo de muestra foliar de cada tratamiento térmico.

### **3.3.4 Medición relativa de carbonilos totales en respuesta al estrés térmico**

Los niveles relativos de oxidación de los componentes solubles se midieron en base a la presencia de los grupos carbonilos reactivos a la 2,4-dinitrofenildidrazina (DNPH, por sus siglas en inglés). El protocolo utilizado se adaptó y modificó del artículo publicado por Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein y Stadtman (1987, pp. 5489-5490).



Primero, se procedió a colocar en tubos de ensayo de 10 mL un volumen de 2 mL del reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0.2% (p/v, disuelta en una solución de HCl 2N) y 2 mg del extracto soluble, que se obtuvo anteriormente en el procesamiento de cada muestra (sección 3.4.1). La reacción se dejó actuar a temperatura ambiente por 2 horas. Concluido dicho tiempo, se adicionó ácido tricloroacético al 20% (p/v) y se dejó reaccionar por ~24 horas a 4°C. Después, se centrifugó las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y a 5000 rpm en el equipo Centrifuge 5804 R marca Eppendorf y se descartó el sobrenadante.

El precipitado naranja, formado a partir de la reacción entre la DNPH y los grupos carbonilo, se lavó tres veces con 1 mL del solvente orgánico etanol/acetato de etilo en relación 1:1 (v/v). Posterior a cada lavado, se procedió a centrifugar las muestras bajo las mismas condiciones descritas y desechando los respectivos sobrenadantes. El pellet obtenido luego del último lavado se resuspendió en una solución de NaOH 1 N y se homogenizó por medio de un ligero toque de vórtex en el equipo Corning® LSE Vortex Mixer de DOT Scientific, Inc.

De forma paralela, se procedió a preparar un blanco para cada una de las muestras analizadas siguiendo la misma metodología explicada, aunque el volumen de DNPH fue reemplazado por una solución de HCl 2N.

Por último, en una microplaca CORNING COSTAR de 96 pocillos, se colocó por triplicado un volumen de 150 µL que correspondía a las muestras estudiadas y sus respectivos blancos. La absorbancia de los grupos carbonilos reactivos a DNPH se determinó por espectrofotometría en el lector de placa multimodal FLUOstar Omega de la compañía BMG LABTECH a una longitud de onda de 365 nanómetros. Este ensayo se realizó de la misma manera para las tres réplicas de cada tratamiento térmico.

### **3.3.5 Curva de calibración del compuesto formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona**

Se realizó una curva de calibrado con el fin de expresar, en valores de concentración, los datos de absorbancia obtenidos de los ensayos de carbonilos totales. La respectiva curva de calibración se la realizó midiendo la absorbancia

a distintas concentraciones del formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona ( $C_7H_6N_4O_4$ ). Este compuesto se sintetizó a partir de la reacción química entre la 2,4 dinitrofenilhidrazina ( $C_6H_6N_4O_4$ ) y el formaldehído ( $CH_2O$ ). La hidrazona fue sintetizada y donada por el Dr. Jorge Heredia, científico del Centro de Investigaciones Transnacionales de la UDLA. En el anexo 3 se muestra la correspondiente reacción química.

A partir de la hidrazona sintetizada se preparó una solución de concentración final  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para lo cual, en una balanza analítica BOECO modelo BBI-31 se pesó 5 mg de este reactivo y se lo diluyó en 1 mL de etanol al 96%. La solución se preparó en un tubo de vidrio de tapa rosca y se calentó en baño maría hasta que el reactivo se disolviera por completo.

Una vez preparada la solución, se procedió a realizar 16 diluciones seriadas de volumen  $200 \mu\text{L}$  en relación 1:2 (solución de hidrazona/etanol al 96%). Los volúmenes de cada dilución se colocaron por triplicado en una microplaca CORNING COSTAR de 96 pocillos empezando desde la hidrazona de concentración  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta la última dilución realizada, cuya concentración era  $1.53 \times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Además, en la misma placa se cargó por triplicado  $100 \mu\text{L}$  del blanco, que correspondía al etanol con el cual se diluyó la hidrazona sintetizada.

La lectura de las absorbancias correspondientes a las distintas concentraciones de la hidrazona y el blanco se midieron por espectrofotometría en el equipo Centrifuge 5804 R marca Eppendorf, a la misma longitud de onda con el que se realizó el ensayo de carbonilos, es decir, a 365 nanómetros. La absorbancia neta se obtuvo restando el valor de absorbancia de la dilución de la hidrazona menos la absorbancia del etanol (blanco).

De entre los diferentes datos de absorbancia medidos para cada concentración de hidrazona, sólo se seleccionó aquellos valores que se encontraban en el rango de absorbancias obtenidas anteriormente en los ensayos de carbonilos totales. La curva de calibración se expresó en función de los  $\text{nmoles}\cdot\text{mL}^{-1}$  de formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona.

### **3.3.6 Medición relativa de oxidación lipídica en respuesta al estrés térmico**

Los niveles relativos de oxidación de lípidos se determinaron respecto a la formación de grupos Malondialdehído (MDA) reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés). La siguiente metodología descrita se adaptó del artículo de investigación de Du y Bramlage (1992, pp. 1566-1567).

En primer lugar, en una balanza analítica BOECO modelo BBI-31 se pesó ~50mg de muestra foliar correspondiente a los tratamientos térmicos de estrés directo y gradual. Esta cantidad de muestra se colocó en tubos microcentrífuga de 1.5 mL, a la que luego se le adicionó un volumen de 250 µL de acetona. Después, con un pistilo estéril se procedió a macerar cada una de las muestras en termobloques de hielo con el fin de conservar la temperatura a 4°C. Ya maceradas las muestras se las centrifugó por 20 minutos a 4°C y a 14000 rpm en el equipo Centrifuge 5804 marca Eppendorf. Los sobrenadantes resultantes se colectaron y colocaron en tubos de vidrio de tapa rosca, seguido de la adición de 125 µL de agua destilada.

En la segunda etapa, se añadió en los mismos tubos una solución de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) al 20% (p/v), seguido de 125 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67% (p/v). Enseguida, se precedió a calentar las muestras en baño María a 92°C por 15 minutos utilizando una plancha de calentamiento Isotemp Stirring hotplate – ceramic de la compañía Fisher Scientific. Transcurrido este tiempo, se sacó los tubos del baño María, se los enfrió en agua común y se los centrifugó a 4°C por 15 minutos y a 14000 rpm en el equipo Centrifuge 5804 R marca Eppendorf.

Los sobrenadantes obtenidos de las diferentes muestras se transfirieron a nuevos tubos microcentrífuga de 1.5 mL y se les añadió 750 µL de agua destilada. De forma paralela, un blanco fue preparado para cada muestra en base al mismo principio explicado previamente, aunque el volumen que se adicionó de acetona se lo reemplazó con agua destilada.

Tanto las soluciones de las muestras como el blanco se homogenizaron mediante un toque de vórtex en el equipo Corning® LSE Vortex Mixer de la empresa DOT Scientific, Inc. Luego, en una microplaca CORNING COSTAR de 96 pocillos, se depositó por triplicado un volumen de 150  $\mu\text{L}$  correspondiente a las muestras analizadas y sus respectivos blancos. La absorbancia de las muestras y los blancos se midieron por espectrofotometría en el lector de placa multimodal FLUOstar Omega de la compañía BMG LABTECH a una longitud de onda de 532 nanómetros. Este experimento se realizó de la misma manera para las tres réplicas de cada tratamiento térmico.

Los valores netos de absorbancia se determinaron mediante la diferencia de las absorbancias entre las muestras analizadas y la absorbancia de sus blancos. Para expresar estos datos de absorbancia en valores de concentración referidos como nano moles de  $\text{MDA} \cdot \text{mL}^{-1}$  de muestra se utilizó la siguiente fórmula:

<p><b>Cálculo de concentración en [<math>\text{nmoles} \cdot \text{mL}^{-1}</math>] de Malondialdehído (MDA)</b></p> $\left[ \frac{\text{nmoles}}{\text{ml}} \right] \text{ de MDA} = \left[ \frac{(A_{\lambda 532} - A_{\lambda 600})}{157000} \right] \times 10^6$ <p style="text-align: center;"><math>A_{\lambda 532}</math> = absorbancia a 532 nm  <math>A_{\lambda 600}</math> = absorbancia a 600 nm</p> <p style="text-align: center;"><math>\epsilon</math> = coeficiente de extinción molar de MDA <math>\rightarrow 1.57 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}</math></p> <p><b>NOTA:</b> La <math>A_{\lambda 600}</math> es un valor muy pequeño, y puede ser omitido de la fórmula</p> <p><i>Figura 2.</i> Ecuación para el cálculo de concentraciones en <math>\text{nmoles} \cdot \text{mL}^{-1}</math> de MDA  Tomado de Du y Bramlage (1992, p. 1567).</p>
---

Por último, teniendo en cuenta el peso de muestra que se procesó en este ensayo y el volumen total obtenido, se expresó los valores de oxidación relativa de lípidos en función de  $\text{nmoles} \cdot \text{g}^{-1}$  de Malondialdehído (MDA).

### 3.4 Análisis estadístico

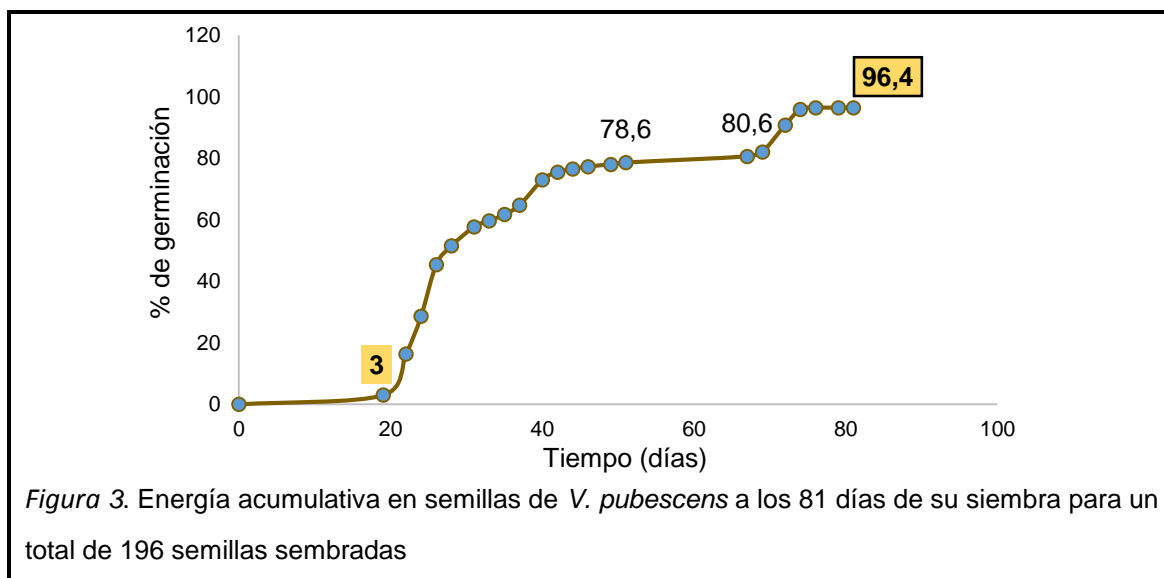
La normalidad de los datos se analizó por medio de una prueba Shapiro-Wilk. Para determinar la diferencia entre los tratamientos térmicos de todas las variables evaluadas se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Este análisis se complementó con una prueba de comparaciones múltiples Tukey a un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ , con el fin de determinar cuál de las medias

de los respectivos tratamientos térmicos diferían entre sí. El análisis estadístico de los resultados se realizó en la plataforma Rcommander del sistema estadístico R-Project (Fox, 2005, pp. 3-10). Todos los tratamientos realizados en este proyecto se repitieron 3 veces para dar validez estadística a los datos obtenidos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Germinación de semillas de *V. pubescens*

El porcentaje de germinación se cuantificó respecto a la emergencia de brotes desde iniciada la siembra hasta los 81 días, obteniéndose al cabo de 19 días, un porcentaje de germinación del 3% (6 plántulas germinadas) y a los 81 días un 96.4% (189 plántulas germinadas) como se observa en la figura 3.



### 4.2 Respuesta al incremento directo de temperatura

Para los respectivos ensayos de estrés térmico directo, se utilizó hojas de *V. pubescens* extraídas de plantas previamente inducidas a un estrés por incremento directo en la temperatura. Las plántulas utilizadas en este ensayo se sometieron por 4 horas a temperaturas de 33.5 y 45°C, usándose como control plántulas mantenidas a temperatura ambiente (~25°C) (Figura 4a).

Una vez finalizado el ensayo de estrés térmico directo a 33.5 y a 45°C se presenciaron notables alteraciones en el estado fenotípico de las plántulas. Así por ejemplo, los tallos y peciolo de las plántulas que se sometieron a un incremento térmico de 45°C mostraron un severo decaimiento y marchitez (Figura 4e-i), mientras que la superficie de sus hojas y peciolo presentaron significativas quemaduras y senescencia foliar (Figura 4f-g-h-i), e incluso en ciertas plántulas se observó abscisión. En contraste, las plántulas sometidas a la temperatura de

33.5°C (Figura 4c), si bien exhibieron ligeras abrasiones a nivel de hojas y peciolo, no se apreció una marchitez significativa o ablandamiento en los tallos, ni se observaron afectaciones mayores en su anatomía, como sí ocurrió en el caso de las plántulas sometidas a 45°C. Esto podría indicar que para *V. pubescens* incrementos súbitos a ~45°C causan severos estragos sobre su anatomía, mientras que temperaturas alrededor de los 33.5°C pueden, de cierta forma, ser mejor toleradas por la planta.



*Figura 4.* Ensayo fenotípico de inducción de estrés por incremento directo de temperatura en plántulas de *V. pubescens* de 75 días de edad

a. Plántulas correspondientes a la temperatura control (temperatura ambiente ~25°C). b. Plántulas previo a ser sometidas a una temperatura de 33.5°C. c. Plántulas luego de 4 horas de ser sometidas a una temperatura de 33.5°C. d. Plántulas previo a ser sometidas a una temperatura de 45°C. e. Plántulas luego de 4 horas de ser sometidas a una temperatura de 45°C. f. Quemaduras sobre superficie foliar luego de estrés a 45°C. g. Marchitez en hojas luego de estrés térmico a 45°C. h. Senescencia foliar luego de estrés térmico a 45°C. i. decaimiento en tallo y peciolo, desecación y senescencia foliar.

#### 4.2.1 Análisis de los ensayos bioquímicos correspondiente al estrés térmico directo

Según la prueba estadística de Shapiro-Wilk, todos los datos obtenidos de los diferentes ensayos bioquímicos (contenidos de sólidos solubles, concentración de proteína, niveles relativos de carbonilación y oxidación de lípidos) que correspondían a las muestras inducidas a un estrés directo de temperatura, mostraron una distribución normal como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Prueba de Shapiro-Wilk por cada ensayo a diferentes niveles del factor temperatura

Ensayo de estrés directo	Estadístico	Valor p <sup>a</sup>
Contenido proteico	0,90865	0,3066
Contenido de sólidos solubles	0,93477	0,5281
Carbonilos totales	0,85131	0,07704
Oxidación de lípidos	0,90626	0,2906

Nota: <sup>a</sup> Para un  $\alpha=0.05$ , un valor de  $p > \alpha$  significa una distribución normal de los datos.

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostró que en los ensayos de estudio: contenido de sólidos solubles, carbonilos totales y lípidos oxidados, las medias de los grupos difería de forma significativa en al menos uno de los niveles del factor temperatura (25, 33.5 y 45°C) (Tabla 2), aprobando por tanto la hipótesis alternativa, de que al menos uno de las medias es diferente entre los tratamientos. Sin embargo, en el caso de los ensayos de concentración proteica los datos no fueron estadísticamente significativos entre los tratamientos térmicos, es decir, no existió un cambio en el contenido proteico entre los niveles de temperatura analizados (Tabla 2); aceptando así la hipótesis nula, de que todas las medias en los tratamientos son iguales.

Tabla 2. Resumen de análisis de varianza de las variables evaluadas en cada ensayo a diferentes niveles del factor temperatura, correspondiente al ensayo de estrés térmico directo

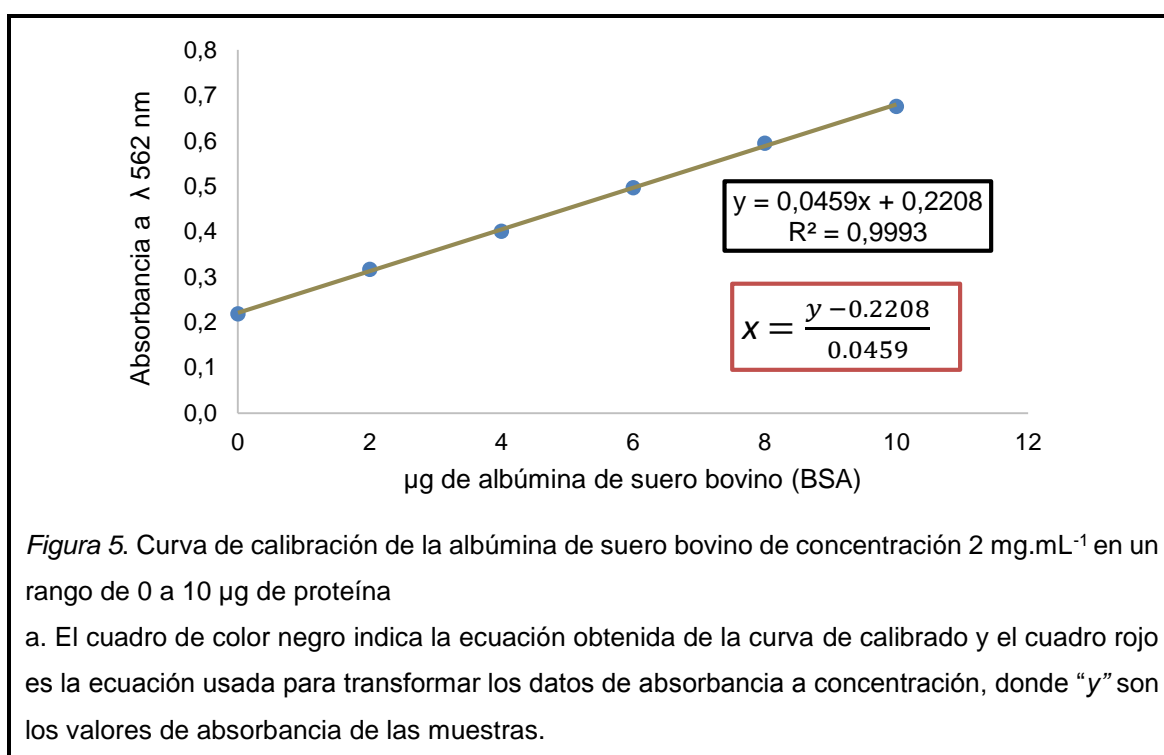
Variables evaluadas	GI	F de prueba	Pr (>F)
Contenido proteico	2	2,431	0,169
Contenido de sólidos solubles	2	11,75	0,00841 **
Carbonilos totales	2	367	5,33e-07 ***
Lípidos oxidados	2	52.33	0,000159 ***

Nota: GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) al valor de probabilidad, el cual indica que de cada variable analizada al menos uno de los grupos es: \*\*\* significante con  $\alpha=0.001$  y \*\* significante con  $\alpha=0.01$ .

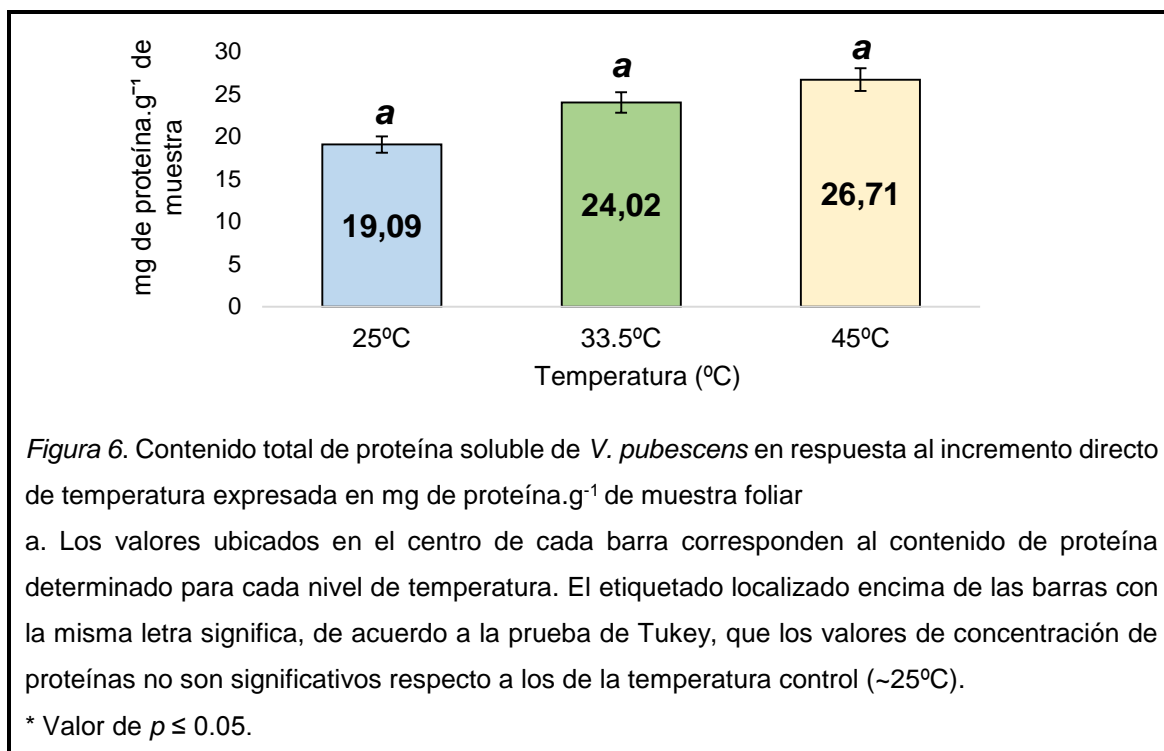


#### 4.2.1.1 Contenido total de proteínas solubles

La cuantificación de concentración de proteína para cada tratamiento se evaluó a partir de la elaboración previa de una curva de calibrado. Para ello se usó como reactivo estándar a la albúmina de suero bovino o BSA de concentración 2 mg.mL<sup>-1</sup> y se midió su absorbancia en un intervalo de 0 a 10 µg de proteína obteniéndose un comportamiento lineal (Figura 5). De esta curva de calibrado se obtuvo una ecuación, con la cual se transformó los niveles de absorbancia de proteínas medidos a 562 nanómetros a valores de concentración.



Las muestras sometidas a un estrés térmico directo exhibieron un aumento en la concentración de proteínas conforme se elevó la temperatura, registrándose un incremento de ~26% a 33.5°C y ~40% a 45°C en relación con la muestras de la temperatura control (~25°C) (Figura 6). No obstante, de acuerdo a las estadísticas, estos valores no representaron cambios estadísticamente significativos; en otras palabras, no hubo un cambio destacado en la concentración de proteínas al incrementarse de forma directa la temperatura (Figura 6).

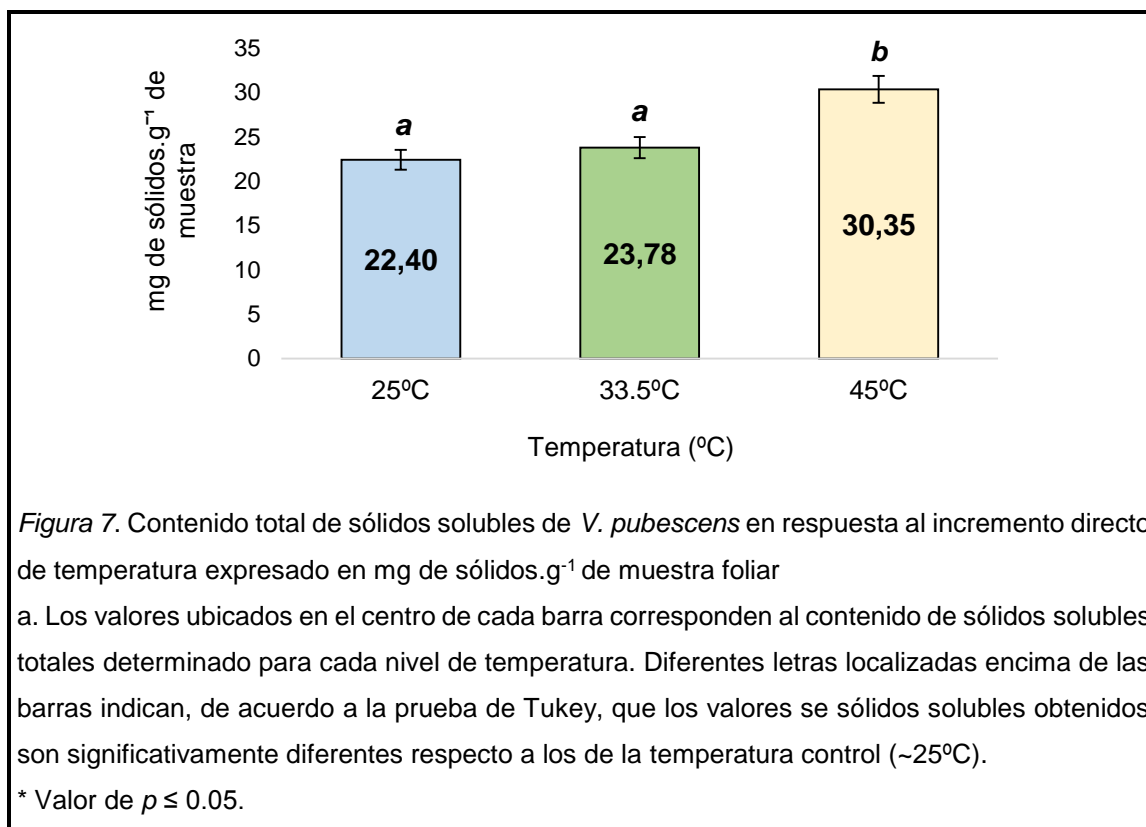


#### 4.2.1.2 Contenido de sólidos solubles totales

La cantidad de sólidos totales presentes en la solución del extracto de cada muestra se determinó por gravimetría. Este dato se utilizó para los posteriores ensayos de carbonilos totales.

De acuerdo a los datos obtenidos, la concentración de los sólidos solubles no difirió estadísticamente entre los tratamientos control y 33.5°C, aunque si se apreció un ligero aumento del 6% a 33.5°C en relación al control (Figura 7).

En cambio, en la temperatura de 45°C si existió una notable diferencia que fue significativa para la prueba de Tukey, con un valor  $p \leq 0.05$ . Bajo esta temperatura los sólidos solubles de las muestras aumentaron en un ~35.5% y ~6.2% respecto a las de la temperaturas de ~25°C (control) y 33.5°C respectivamente (Figura 7).



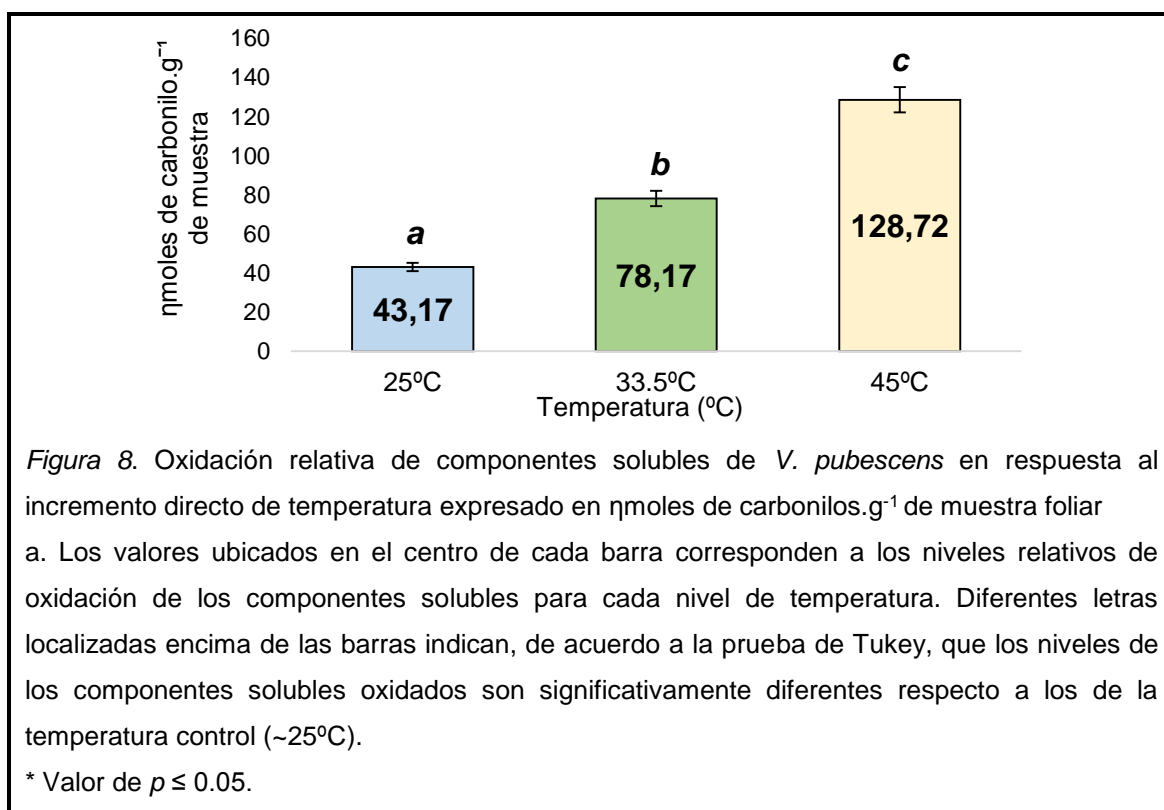
#### 4.2.1.3 Niveles relativos de carbonilación de los compuestos solubles

La concentración de los sólidos solubles totales, evaluados anteriormente en el extracto, permitió tomar la misma cantidad de compuestos solubles para cada una de las muestras y analizar el estado de oxidación de los mismos. Esto se lo realizó debido a que no se midió la oxidación específicamente de las proteínas, sino de todo el extracto obtenido de las hojas de la planta.

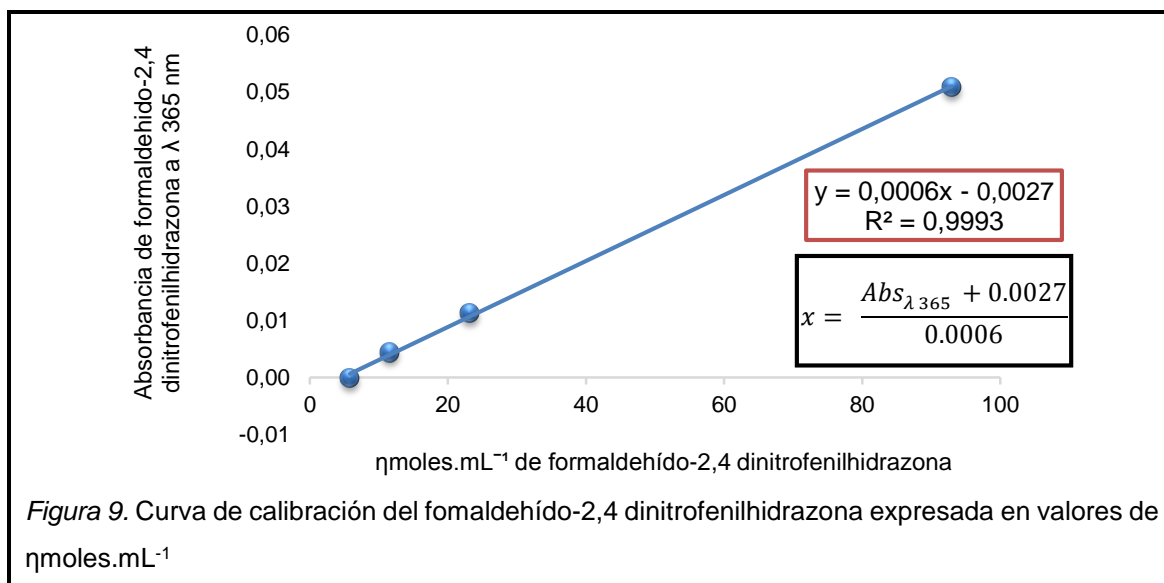
Los niveles de oxidación de estos compuestos solubles totales se determinaron en función de los carbonilos totales, obteniéndose como resultados valores que fueron estadísticamente significativos entre cada tratamiento, según el test de Tukey para un valor de  $p \leq 0.05$  (Figura 8)

Los valores obtenidos indicaron que a medida que se incrementaba de forma directa la temperatura, también lo hacían los niveles de carbonilación de los compuestos solubles, encontrándose aumentos en un 81 y 198% para 33.5 y

45°C respectivamente, en comparación con los del control (temperatura ~25°C) (Figura 8).



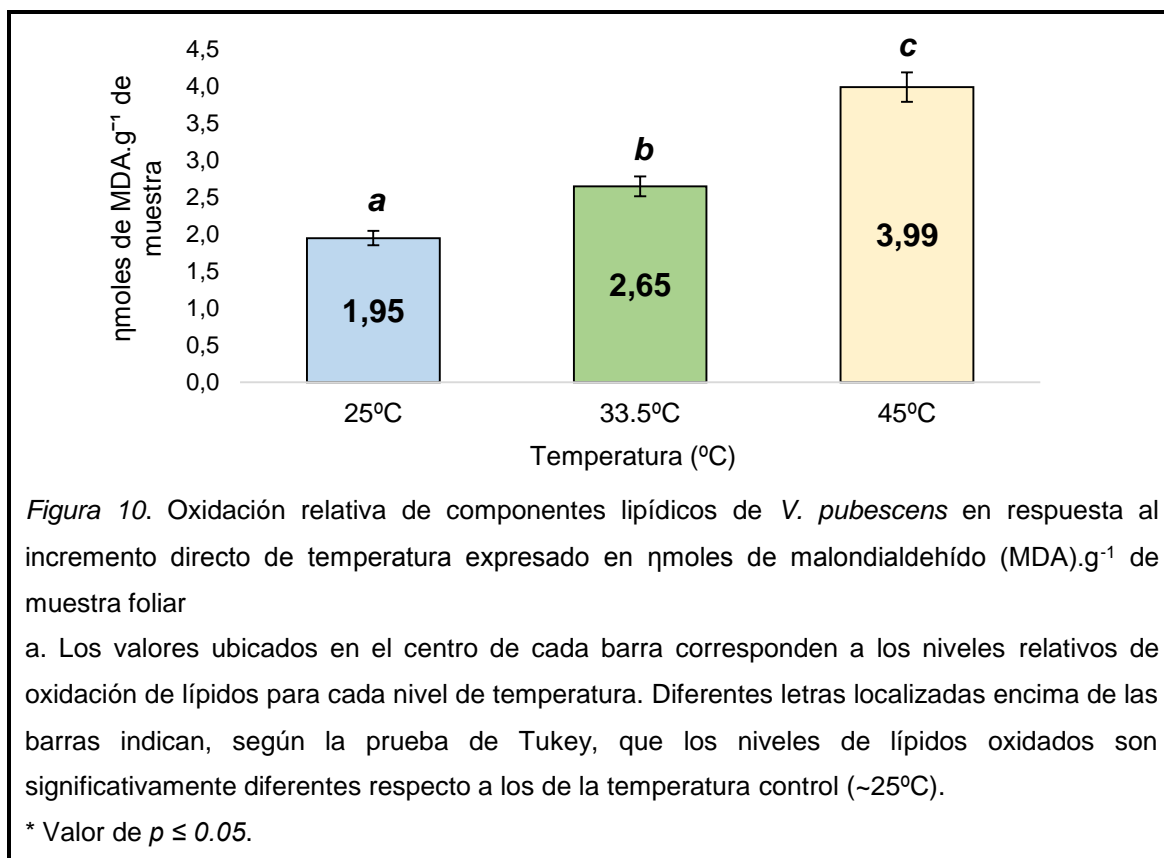
Las medidas de absorbancia de los grupos carbonilo se transformaron a valores de concentración mediante la ayuda de una curva de calibrado con el compuesto orgánico formaldehído-2,4 dinitrofenilhidrazona, de concentración 5 mg.mL<sup>-1</sup>. En la siguiente figura 9 se observa el rango de concentraciones preparados para esta hidrazona, mismos que fueron  $1,953 \times 10^{-2}$ ,  $4,88 \times 10^{-3}$ ,  $2,44 \times 10^{-3}$  y  $1,22 \times 10^{-3}$  mg.mL<sup>-1</sup> expresados en ηmoles.mL<sup>-1</sup> a partir del peso molecular de 210.15 g.mol<sup>-1</sup> correspondiente al compuesto formaldehído – 2,4 dintrofenilhidrazona.



Las absorbancias de las concentraciones descritas previamente estaban dentro del mismo intervalo que las de los carbonilos correspondientes a los compuestos solubles de las muestras evaluadas. De la respectiva curva de calibrado se obtuvo una ecuación (Anexo 4), mediante la cual se transformó los valores obtenidos de absorbancia a ηmoles.mL<sup>-1</sup> de carbonilos expresados en función del formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona.

#### 4.2.1.4 Niveles relativos de peroxidación lipídica respecto al contenido de MDA

Uno de los productos derivados de la peroxidación de lípidos es el Malondialdehído o abreviado MDA. La cuantificación relativa de este compuesto se utilizó como indicador para determinar el daño lipídico provocado por el estrés térmico directo. En comparación con las muestras de la temperatura control (~25°C), a 33.5 y 45°C se evidenció un aumento en la concentración de este aldehído de ~36 y ~105% respectivamente (Figura 10); asumiendo por tal motivo, que los niveles de oxidación en los componentes lipídicos aumentaron como consecuencia de la inducción directa de estrés térmico. Esta información se corroboró por una prueba de Tukey la cual indicó diferencia significativa entre todos los tratamiento térmicos que se evaluaron (Figura 10).



### 4.3 Respuesta al incremento gradual de temperatura

Con el propósito de contrastar los resultados obtenidos de los ensayos previamente presentados del estrés térmico directo, se decidió agregar un ensayo de estrés gradual. Para lo cual, se utilizaron hojas de *V. pubescens* extraídas de plantas previamente inducidas a un estrés por incremento progresivo en la temperatura.

Las plántulas utilizadas en este ensayo se sometieron a un incremento gradual de temperatura cada 12 horas empezando desde 27.5 hasta 45°C (Figura 11), usándose como control plántulas mantenidas a temperatura ambiente (~25°C) (Figura 11a). A diferencia del ensayo de estrés directo, las plántulas del ensayo de estrés térmico gradual no presentaron daños en su anatomía hasta después de una temperatura de 40°C. Desde las temperaturas de 42.5 a 45°C, las plántulas empezaron a manifestar leves afectaciones en su anatomía.

Específicamente a 45°C se observó ligeras quemaduras sobre las hojas y ciertos peciolo. Sin embargo, los tallos no mostraron daño aparente ni decaimiento

como lo presenciado en las plántulas sometidas a esta misma temperatura pero del ensayo de estrés directo (Figura 4e). Así mismo, las quemaduras presentadas sobre la superficie foliar fueron diminutas y nada severas en contraste con las del estrés térmico; de hecho no se observó senescencia, deshidratación excesiva ni marchitez foliar como sí ocurrió con las plántulas del ensayo de estrés directo (Figura 4f-g-h-i).

En adición, para este experimento también se incluyó un tratamiento de recuperación; es decir, una etapa en el que las plántulas, luego de someterse a toda una ronda de estrés gradual, se dejaban por un periodo de 72 horas en recuperación antes de extraerle sus hojas (Figura 11j). Dicho ensayo se realizó para subsecuentemente estudiar si existía alguna alteración en la expresión de genes *H2A.Z* o cambiaban los niveles de oxidación (compuestos solubles y lípidos) con respecto a la temperatura de 45°C y el control. En cuanto a la respuesta fenotípica, no se observó una diferencia cualitativa en el estado anatómico de estas plántulas, con relación a cuando salieron recién de la temperatura de 45°C.

En general, este ensayo cualitativo permite asumir que con un estrés térmico gradual o progresivo en el tiempo, *V. pubescens* logra de cierto modo aclimatarse y presenta solo agudos daños en su anatomía a una temperatura final de 45°C.

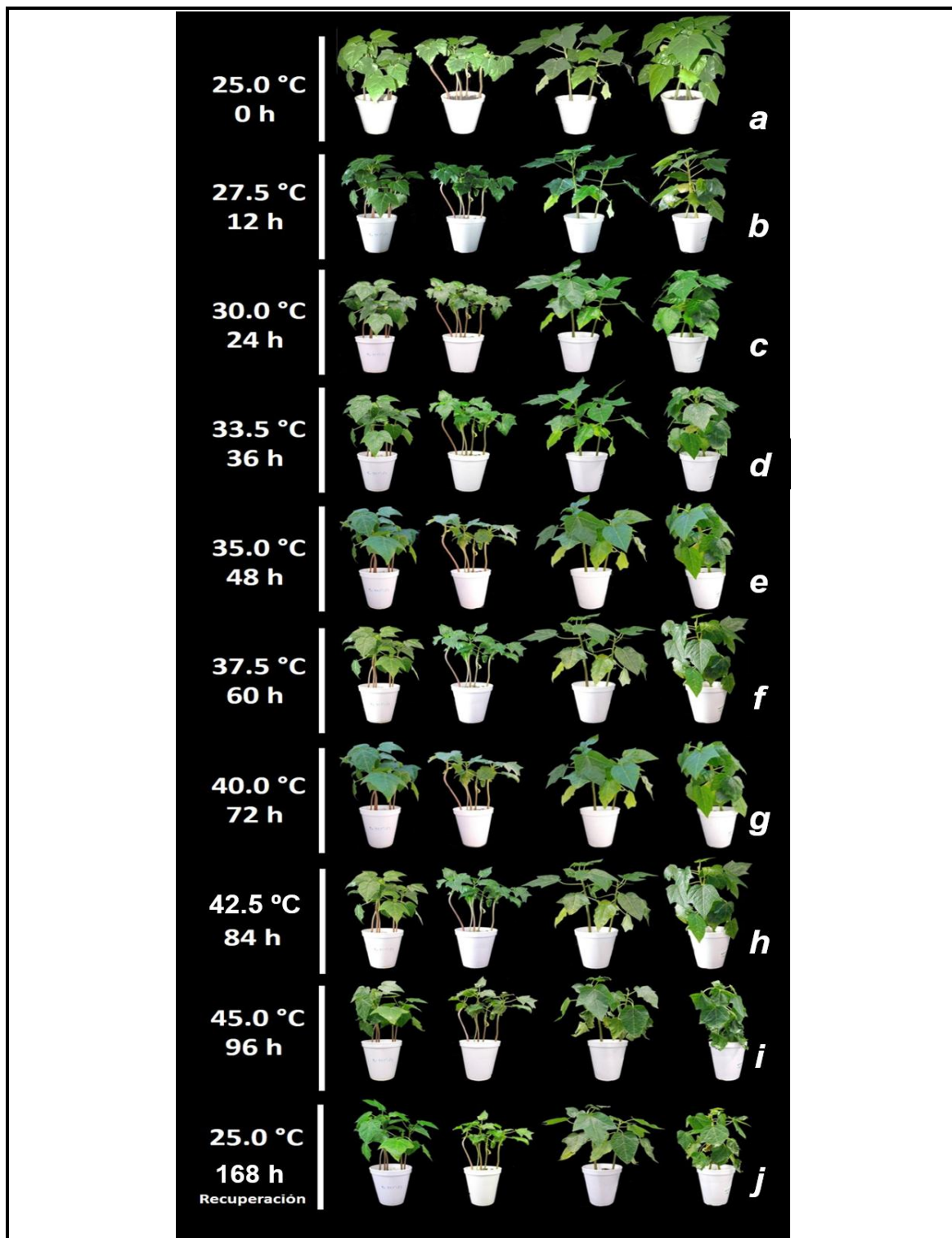


Figura 11. Respuesta fenotípica de plántulas de *V. pubescens* de 75 días de edad frente al incremento gradual de temperatura de ~25 a 45°C

a. Plántulas correspondientes a la temperatura control (temperatura ambiente ~25°C). b. Plántulas sometidas a un régimen de 27.5°C/12 horas de iniciado el ensayo. c. Régimen de 30°C/24 horas. d. 33.5/36 horas. e. 35°C/48 horas. f. 37.5°C/60 horas. g. 40°C/72 horas. h. 42.5°C/84 horas. i. 45°C/96 horas. j. ~25°C/72 horas (fase de recuperación).



### 4.3.1 Análisis de los ensayos bioquímicos correspondiente al estrés térmico gradual

Como se puede observar en la tabla 3, de acuerdo a la prueba estadística de Shapiro-Wilk, los distintos ensayos bioquímicos (contenidos de sólidos solubles, concentración de proteína, carbonilos totales y oxidación de lípidos), que provenían de las muestras inducidas a un estrés gradual de temperatura, mostraron una distribución normal en los datos.

Tabla 3. Prueba de Shapiro-Wilk por cada ensayo a diferentes niveles del factor temperatura

Ensayo de estrés gradual	Estadístico	Valor p <sup>a</sup>
Contenido proteico	0,94454	0,559
Contenido de sólidos solubles	0,97197	0,9303
Carbonilos totales	0,95121	0,6547
Oxidación de lípidos	0,92453	0,3258

Nota: <sup>a</sup> Para un  $\alpha=0.05$ , un valor de  $p > \alpha$  significa una distribución normal de los datos.

De acuerdo al análisis de varianza de un factor (ANOVA), solo los valores correspondientes a la concentración de los sólidos solubles totales no fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos térmicos del estrés gradual, por lo que en este caso se rechazó la hipótesis alternativa (Tabla 4). A diferencia de las otras variables de estudio: contenido proteico, carbonilos totales y lípidos oxidados, cuyas medias de los grupos sí diferían de forma significativa en al menos uno de los niveles del factor temperatura (~25°C, 33.5°C, 45°C y recuperación) (Tabla 4), aprobando por tanto la hipótesis alternativa, de que al menos uno de las medias es diferente entre los tratamientos para la variable “contenido de sólidos solubles”.

Tabla 4. Resumen de análisis de varianza de las variables evaluadas en cada ensayo a diferentes niveles del factor temperatura, correspondiente al ensayo de estrés térmico gradual

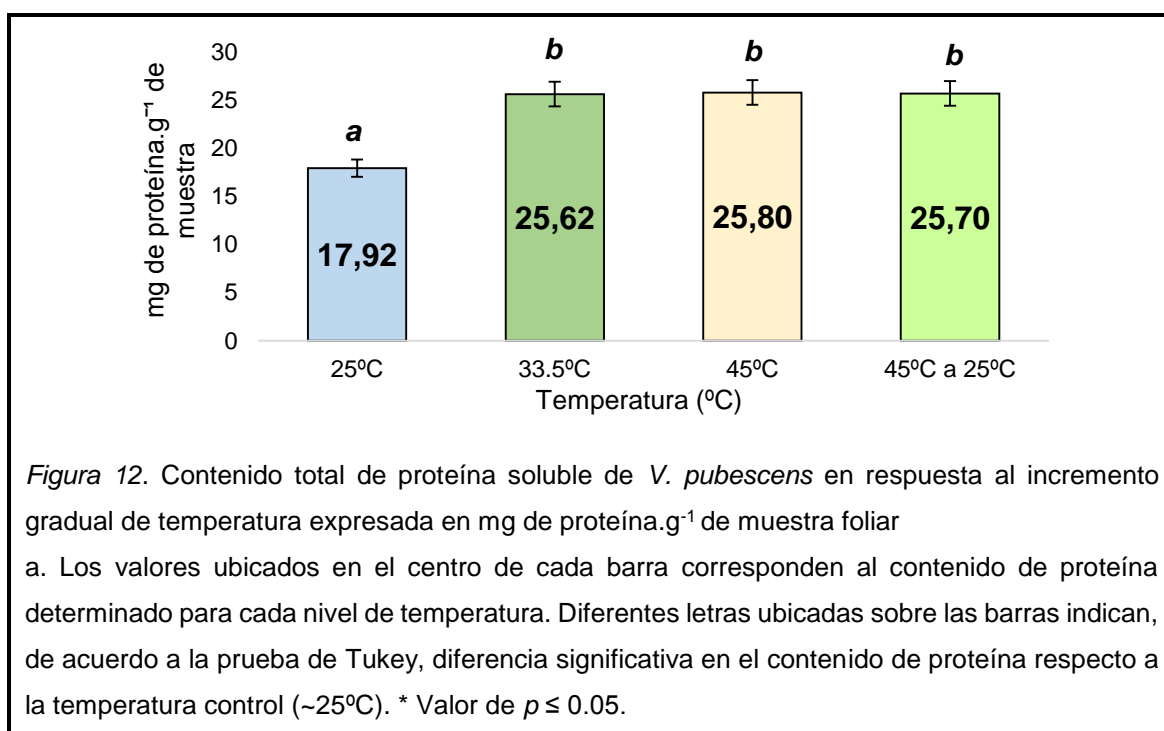
Variables evaluadas	GI	F de prueba	Pr (>F)
Contenido proteico	3	5,575	0,0232 *
Contenido de sólidos solubles	3	2,403	0,143
Carbonilos totales	3	24,69	0,000213 ***
Lípidos oxidados	3	4,399	0,0417 *

Nota: GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) al valor de probabilidad, el cual indica que de cada variable analizada al menos uno de los grupos es: \*\*\* significativo con  $\alpha=0.001$  y \* significativo con  $\alpha=0.05$ .

### 4.3.1.1 Contenido total de proteínas solubles

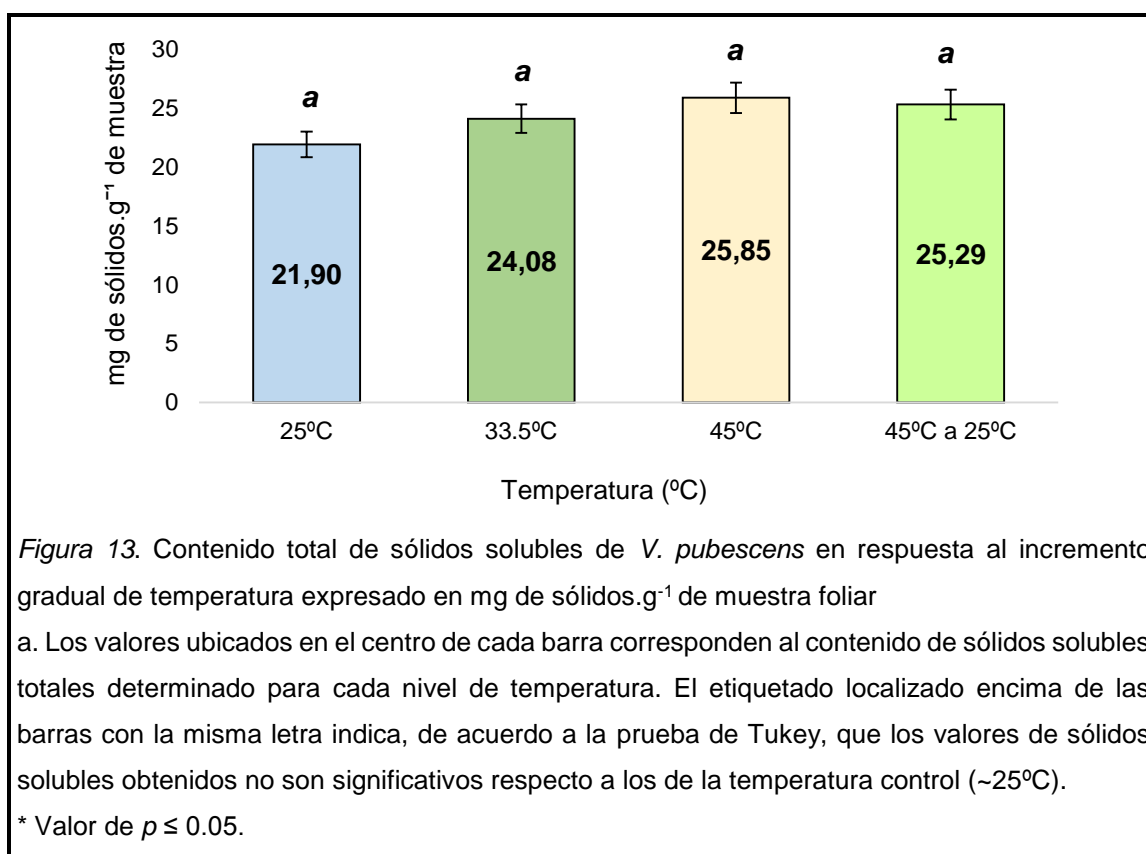
Al igual que en el experimento de estrés térmico directo, el contenido proteico de las muestras del ensayo de estrés gradual se calculó con la ayuda de una curva de calibración, en la que se usó a la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Figura 5).

La concentración total de proteínas solubles en respuesta al estrés térmico gradual exhibió un incremento de un 43%, tanto para el tratamiento a 33.5°C como para el ensayo de recuperación (45 a ~25°C) en comparación con el control. Así también, a 45°C se reportó un aumento en el contenido proteico de 44% (Figura 12). Estos datos correspondientes a los tres tratamientos mencionados difirieron estadísticamente con respecto a la concentración de proteína del control (~25°C). En adición, según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el contenido proteico entre las temperaturas de 33.5°C, 45°C y recuperación (45 a ~25°C) no fue significativo; es decir, que entre dichas temperaturas los niveles de proteína soluble son teóricamente similares. Además, al comparar los mg de proteína obtenidos de las muestras de recuperación, con respecto a las muestras sometidas a 45°C, solo se observó una diferencia de menos del 0.5% en la concentración proteica, resultando en un valor no significativo (Figura 12).



### 4.3.1.2 Contenido de sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales presentaron leves incrementos de un 10%, 18% y 15.5% sobre las respectivas temperaturas de 33.5°C, 45°C y 45 a ~25°C (recuperación) en comparación con el control (Figura 13). Sin embargo, de acuerdo a la prueba ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey, estos resultados no fueron significativos para ninguna de las temperaturas evaluadas; en otras palabras, la concentración de los sólidos solubles totales no varía estadísticamente al incrementarse la temperatura a 33.5 y a 45°C de forma gradual. Así mismo, el valor de sólidos solubles obtenido del ensayo de recuperación bajó en solo un 2.2% en relación con el tratamiento a 45°C, resultando en un valor no significativo (Figura 13).



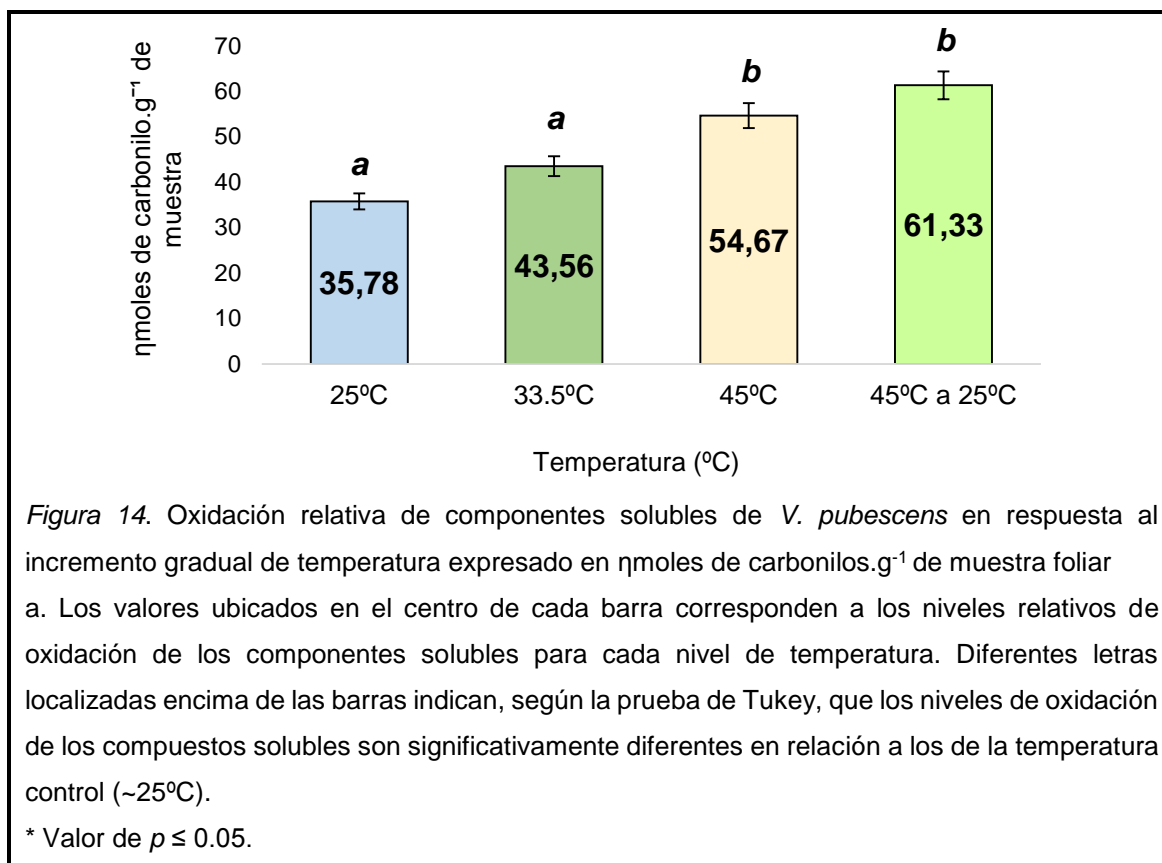
#### **4.3.1.3 Niveles relativos de carbonilación de compuestos solubles**

Las medidas de absorbancia de los carbonilos totales se transformaron a valores de concentración mediante la ecuación derivada de la curva de calibración del formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona (Figura 9 y Anexo 4). La carbonilación de los compuestos solubles constituye una medida relativa de inferencia sobre el daño oxidativo de las biomoléculas, principalmente de proteínas.

El número de carbonilos totales de muestras foliares inducidas a un estrés térmico progresivo varió entre los tratamientos de temperatura (Figura 14). Específicamente, a la temperatura de 45°C y en el ensayo de recuperación (45 a ~25°C) se obtuvo un aumento en la concentración de carbonilos totales de 53% y 171.4% respectivamente, con respecto al control (~25°C) (Figura 14). Estos datos obtenidos en ambas temperaturas, de acuerdo al test de comparaciones múltiples de Tukey, si resultaron ser significativamente diferentes en relación a las temperaturas de ~25°C y a 33.5°C.

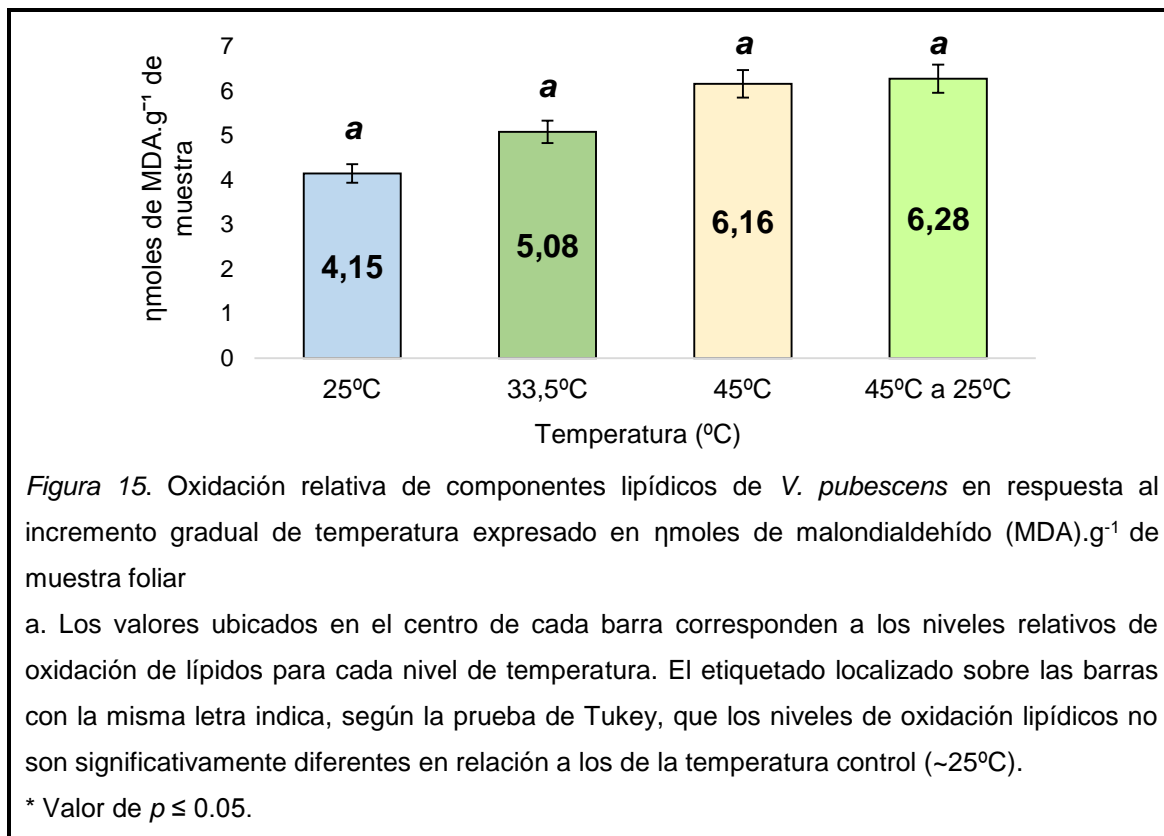
Las muestras sometidas a 33.5°C también presentaron un aumento en los carbonilos totales de 21.7% en relación al control (Figura 14); sin embargo, según las estadísticas, este contenido de carbonilos fue similar a los evaluados en la temperatura ambiente (control). De igual forma, al contrastar los resultados entre las muestras de 45°C y las del ensayo de recuperación se reportó un aumento en el contenido de carbonilos de un 12.2% correspondiente al ensayo de recuperación (Figura 14), aunque la prueba de Tukey mostró que la concentración de carbonilos totales se mantuvo en un margen similar para ambos tratamientos.

Sintetizando, este conjunto de resultados indican que estadísticamente el daño oxidativo en los compuestos solubles, provocado por un estrés térmico progresivo, no difiere a 33.5°C pero si aumenta a 45°C en comparación con el control. También, los niveles de carbonilos totales del ensayo de recuperación no se reestablecen o disminuyen, sino más bien resultan ser similares a los valores obtenidos en la temperatura de 45°C (Figura 14).



#### 4.3.1.4 Niveles relativos de peroxidación lipídica respecto al contenido de MDA

Al analizar los resultados de los ensayos de oxidación de lípidos, se observó al respecto, un incremento en la concentración de Malondialdehído (MDA) del 22.4%, 48.4% y un 51.3% para las correspondientes temperaturas de 33.5°C, 45°C y 45 a ~25°C (fase de recuperación) en comparación con el control (Figura 15). Sin embargo, estos aparentes incrementos se descartaron mediante la prueba de Tukey, la cual indicó que los valores de concentración de MDA en ninguno de los tratamientos térmicos fueron significativamente diferentes. Asumiendo por tanto, que al someter las plántulas a un estrés por incremento gradual de temperatura, los niveles de oxidación de los componentes lipídicos no varían estadísticamente con respecto al control (~25°C).



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Germinación en *V. pubescens*

Los estudios de propagación sexual por semilla es uno de los mecanismos más importantes y necesarios para poder conocer el potencial de emergencia y evaluar la conservación *in situ* de una planta de interés (Benítez *et al.*, 2013, pp. 187-188). La especie usada en este estudio *V. pubescens* presentó una germinación a los 20 días de apenas un 3% y alrededor de 58% a los 30 días (Figura 3). Este resultado es muy similar a otras investigaciones realizadas, en las cuales se explica que las semillas de *V. pubescens* normalmente empiezan a germinar a los 30 días exhibiendo un 60% de germinación (Duarte y Paull, 2015, p. 205).

Como Acosta y colaboradores (2012, pp. 69-70) ya lo dijeron, los factores internos tales como: el oxígeno, la cantidad de luz, cantidad de agua, la profundidad a la que se siembre la semilla, la humedad, la temperatura e incluso la calidad y tipo de tierra que se use, pueden afectar el potencial germinativo. Es probable, por tanto, que el bajo número de semillas germinadas (6 de 198 = 3%) obtenido a los 20 días se haya debido a dichos factores internos. No obstante, este porcentaje creció considerablemente al cabo de 81 días registrándose un 96% de germinación (Figura 3), sugiriendo que posiblemente la demora de germinación en el resto de semillas se suscitó por una corta dormancia. Esta idea se apoya con otros reportes, los cuales mencionan que las semillas de *V. pubescens* almacenadas a temperatura ambiente por 4 meses presentaron un 80% de germinación, en comparación con el 36% obtenido de semillas provenientes de frutos recién colectados (Duarte y Paull, 2015, p. 205).

### 5.2 Respuesta fenotípica de *V. pubescens* al estrés térmico directo y/o gradual

Los efectos derivados del aumento de temperatura cambian en dependencia de varios factores: el tipo de estrés (directo o gradual), el tiempo de duración del estrés y la intensidad de la temperatura (Lipiec *et al.*, 2013, p. 463). Aunque también, los daños provocados por los fuertes episodios de calor están ligados

a la etapa de desarrollo de la planta, la especie, variedad, el tejido vegetal e inclusive el genotipo (Bita y Gerats, 2013, p. 2).

Según otras investigaciones el estrés por aumento de temperatura imparte serios daños y lesiones sobre la anatomía de las plantas, entre los que se citan: abrasiones y quemaduras en ramas, hojas y tallos, daños sobre las puntas y márgenes de las hojas, desecado en el área foliar, inhibición y afectaciones en raíz y brotes, aborto de flores y frutos, senescencia y abscisión foliar (Hasanuzzama *et al.*, 2013b, p. 9647). Asimismo, Duarte y Paull (2015, p. 203) señalan que en el particular caso de *V. pubescens*, las temperaturas extremas afectan el follaje y el correcto desarrollo de los frutos. Todas estas observaciones indicadas en esos documentos, son consistentes con la respuesta fenotípica que se obtuvo en este estudio, luego de inducir las plántulas de *V. pubescens* a un incremento directo de temperatura (Figura 4). En este tipo de estrés se observó varias lesiones a 45°C (Figura 4e), destacándose: el decaimiento de los tallos, severa marchitez, desecamiento en hojas, serias quemaduras sobre la base de hojas y peciolo (Figura 4f-g-h-i) e inclusive en algunas plántulas la presencia de abscisión foliar. Un parecido comportamiento fue observado por Okunlola y Adelusi (2013, pp. 509-511) al someter las plantas de *C. papaya* a un estrés por temperatura a 40°C, en donde los autores evidenciaron: alteraciones en el tamaño de tallos y área foliar, afectaciones en la longitud de peciolo y variaciones en el peso seco y peso fresco de la planta.

Por otra parte, a un estrés directo de 33.5°C no se evidenció lesiones significativas en la estructura de las plántulas. Estos datos sugieren que *V. pubescens* en su estado de plántula o crecimiento primario tolera de mejor manera las temperaturas intermedias alrededor de 33.5°C, pero aumentos súbitos a ~45°C por un tiempo de 4 horas ocasionan severas lesiones que la planta no logra mitigar.

En cuanto a los ensayos de inducción de estrés por incremento gradual de temperatura, específicamente a 45°C, solo se presenciaron leves quemaduras sobre la base de las hojas y ciertos peciolo. Cabe destacar que las plántulas pasaron 12 horas a esta temperatura, en comparación con las 4 horas a las que



fueron sometidas las plántulas del ensayo de estrés directo. Las diferencias son contundentes y pese a que las plántulas del ensayo gradual estuvieron por un mayor tiempo a 45°C, estas al ser sometidas a un incremento progresivo de temperatura mostraron leves daños morfológicos, en contraste con los estragos presenciados en el ensayo de estrés directo, anteriormente descritos. En otras investigaciones se reportó una similar respuesta, concretamente en *Fragaria x ananassa*, donde se evaluó el efecto de estos dos tipos de estrés térmico (directo y gradual), obteniéndose como resultado un menor grado de afectación sobre las plántulas tratadas con un estrés progresivo (Ergin, Kesici y Gulen, 2012, pp. 27-28; Kesici *et al.*, 2013, pp. 244-245).

Hasanuzzaman y colaboradores (2013b, p. 9643) mencionan que la supervivencia de las plantas frente a condiciones de estrés térmico dependerá del grado en que se dé el estrés y la rapidez en que estos organismos perciban el estrés, así como de sus mecanismos de defensa. Tomando en cuenta esta referencia, es factible asumir que a un estrés progresivo *V. pubescens* tiene un mayor tiempo para aclimatarse, reconocer el incremento de temperatura y ante ello, liberar las mejores respuestas para lidiar con el estrés calórico.

Contrastando los dos resultados fenotípicos derivados de los ensayos de estrés directo y gradual, se puede asumir que *V. pubescens* es susceptible a un choque térmico directo a 45°C. Sin embargo, a esta misma temperatura pero suscitada de forma progresiva, la especie en estudio exhibe solo ligeras afectaciones en su anatomía, lo cual refleja un cierto grado de tolerancia y aclimatación de esta especie.

Adicionalmente, es importante mencionar que aunque *V. pubescens* es una planta de alta montaña, en Ecuador existe un clima tropical, por lo que esta especie debe estar mejor adaptada a las temperaturas elevadas, lo cual pudo haber ayudado a que las plántulas toleren el estrés térmico progresivo.

### 5.3 Cambios en los niveles de contenido proteico en dependencia del tipo de estrés térmico en *V. pubescens*

Los niveles en el contenido proteico se ven afectados por el estrés térmico, debido a que dicho factor abiótico, en dependencia de la especie y genotipo, decrece la síntesis normal de proteínas, provoca un mal plegamiento, causa proteólisis, desnaturalización e irrumpe en la estabilidad de estas moléculas (Bita y Gerats, 2013, pp. 2-5; Hasanuzzaman *et al.*, 2013, p. 9651).

En el presente trabajo, al analizar la concentración de proteína correspondiente a las muestras foliares inducidas a un estrés térmico directo, no se observó ningún cambio estadísticamente significativo (Figura 6); mientras que las muestras sometidas a un estrés térmico gradual si exhibieron un incremento significativo en el contenido proteico a 33.5°C, el cual se mantuvo constante a 45°C y en el tratamiento de 45 a ~25°C (recuperación) (Figura 12).

En las referencias revisadas se documenta que durante los períodos de estrés calórico todas las plantas sintetizan y acumulan las denominadas proteínas de choque térmico o HSP (de sus siglas en inglés *Heat Shock Proteins*), también conocidas como proteínas de estrés o moléculas de estrés inducido; aunque el nivel de síntesis de estos metabolitos presenta considerables cambios entre las especies y genotipos (Al-Whaibi, 2011, pp. 139-140; Asthir, 2015, pp. 205-206; Trivedi, 2015, p. 156; Usman *et al.*, 2014, pp. 204-205). Estas proteínas se agrupan dentro de cinco familias dependiendo de su tamaño molecular en: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, y las pequeñas HSP de 12 a 40kDa (Usman *et al.*, 2014, p. 205; Asthir, 2015, p. 206). Es posible, por tanto, que la mayor concentración de proteínas presentes en el ensayo de estrés gradual a 33.5 y 45°C se deba a la acumulación de estas HSP. Esta suposición resulta consistente en los datos obtenidos por Kumar y colaboradores (2012, p. 85), quienes también observaron que los niveles de transcritos de la HSP90 se incrementaron en 4.3, 4.5 y 6.5 veces más a 30, 35 y 40°C, respectivamente. La especie *Sorghum bicolor* también presentó una síntesis de varias HSP ante condiciones de estrés por calor (Gosavi *et al.*, 2014, pp. 3359-361).

Wahid y colaboradores (2012, p. 144) manifiestan que la síntesis de las HSP tiene vital importancia en las respuestas de las plantas a condiciones de estrés térmico. De hecho, en muchos artículos se concluye que las plantas que presentan los mayores niveles de expresión de estas HSP, también exhiben los mayores grados de termo tolerancia (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9663; Lipiec *et al.*, 2013, p. 468; Qu *et al.*, 2013, pp. 203-204; Liu *et al.*, 2015, p. 6). Esto se debe a que las HSP cumplen dos funcionalidades: protegen a las plantas de lesiones y ayudan a contrarrestar los daños provocados por el estrés térmico (Wahid *et al.*, 2012, p. 144). Además, se sabe que la inducción de las HSP permanece elevada en especies termo resistentes (Bita y Gerats, 2013, p. 9). En un experimento en el que se sometió las plántulas de maíz, trigo y centeno a un choque térmico se evidenció que solo el maíz presentó la síntesis de varias HSP, mientras que el trigo y centeno solo un tipo de HSP; esto trajo como consecuencia una mayor tolerancia al calor en el caso del maíz, a la vez que las otras especies fueron susceptibles (Wahid *et al.*, 2012, p. 144).

Tomando de referencia la información descrita, es factible asumir, que las plántulas sometidas a un estrés gradual al aumentar la concentración de sus proteínas, probablemente las HSP, mitigaron de alguna forma los estragos causados por el estrés térmico, lo cual conllevó a que solo se produjeran ligeros daños sobre su anatomía, en contraste con las graves lesiones morfológicas observadas en las plántulas de estrés directo a 45°C (Figura 4f-g-h-i), las cuales no aumentaron su concentración de proteínas ante el estrés térmico directo.

La diferencia de concentraciones proteicas entre los ensayos de estrés directo y estrés gradual yace precisamente en el tipo de estrés. Según Joshi y Chinnusamy (2014, p. 370) las plantas adquieren una termo tolerancia y logran resistir las altas temperaturas si previamente son expuestas a temperaturas moderadas o medianas antes de someterse a temperaturas letales. Asimismo, Wahid y colaboradores (2007, p. 212) afirman que la termo tolerancia puede inducirse en las plantas si se incrementa de forma gradual la temperatura hasta llegar a niveles letales. Dicha aclimatación viene dada en parte por la habilidad de acumular estas HSP. Esto se comprueba en una investigación realizada en *A. thaliana*, en donde las plantas tratadas previamente a 38°C y luego a 45°C

presentaron una mayor acumulación de transcritos codificantes de HSP70 y pequeñas HSP; a diferencia de las plántulas sometidas a un estrés abrupto de 45°C, que presentaron menores niveles de estas proteínas de estrés y además mayores efectos nocivos (Mittler, Finka y Golubino, 2012, p. 120). Asimismo, en *Agrostis palustris* se evidenció la síntesis de nuevas HSP al estresar las plantas de forma progresiva desde 20 a 40°C, lo cual no ocurrió con las plantas que se sometieron de forma directa a las mismas temperaturas (He, Liu y Huang, 2005, pp. 522-524).

Por otra parte, la presencia de enzimas antioxidantes también pudo haber contribuido al aumento de concentración de proteínas en las muestras del ensayo de estrés gradual. Se sabe que estas enzimas actúan como detoxificantes de las especies reactivas de oxígeno y que suelen presentar una sobreexpresión en plantas tolerantes al estrés térmico (Bita y Gerats, 2013, p. 8; Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9655; Joshi y Chinnusamy, 2014, p. 374). Así por ejemplo, *Sorghum bicolor* ha mostrado un incremento en la síntesis de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (PRX) a una temperatura de 40°C (Gosavi *et al.*, 2014, pp. 358-359). Similar comportamiento se obtuvo en las plantas de *Fragaria x ananassa*, las cuales ante condiciones de estrés gradual exhibieron un incremento significativo de la enzima PRX a diferencia de las muestras foliares tratadas con un choque térmico directo (Gulen y Eris, 2004, pp. 741-742). Hammed, Goher e Iqbal (2012, pp. 286-288) también observaron una alta síntesis de las enzimas SOD, CAT y ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de trigo inducidas por 20 horas a una temperatura de 45°C. Las plántulas de *Dactylis glomerata* que fueron previamente aclimatadas a una temperatura de 38°C manifestaron igualmente altos niveles de actividad PRX, CAT y SOD (Zhao, Huang, Zhang, Li y Peng, 2014, pp. 13566-13569). *Gossypium hirsutum* (algodón) tuvo una similar respuesta en las enzimas CAT, PRX y APR a temperaturas de 38 y 45°C (Gur *et al.*, 2010, p. 1013-1014).

Existen además otras proteínas que se sintetizan bajo condiciones de estrés térmico como parte del mecanismo de defensa de las plantas, entre ellas se encuentran: la ubiquitina, dehidrinasa y proteínas de la embriogénesis tardía o LEA (de sus siglas en inglés *Late Embryogenesis Abundant*) (Bita y Gerats,

2013, p. 9; Trivedi, 2015, p. 156). La proteína factor de elongación termo inestable o EF-Tu (de sus siglas en inglés *Elongation Factor Thermo unstable*) también ha exhibido un notable incremento frente a condiciones de aumento de temperatura, de hecho su papel como chaperona está relacionado con la termotolerancia en ciertas especies (Bita y Gerats, 2013, p. 8).

#### **5.4 Acumulación de metabolitos de bajo peso molecular en respuesta al estrés térmico en *V. pubescens***

Los sólidos solubles totales reportados en este estudio, vienen siendo todos aquellos componentes solubles presentes en el extracto vegetal, tales como: carbohidratos, solutos orgánicos, grasas, minerales, vitaminas, proteínas, entre otros metabolitos (Greer y Weston, 2010, pp. 206-207). Las respuestas que se obtuvieron frente al estrés térmico directo dieron como resultado, un incremento en la concentración de estos compuestos a una temperatura de 45°C (Figura 7); mientras que en ninguno de los tratamientos del ensayo de estrés gradual se reportó un cambio estadísticamente diferente (Figura 13).

En la bibliografía consultada se encontró que entre los principales sólidos solubles, se encuentran los solutos compatibles, también referidos como compuestos orgánicos de bajo peso molecular o simplemente osmolitos (Singh, Poddar y Dar, 2011, pp. 1-2; Trivedi, 2015, p. 155). La acumulación de estos compuestos constituye uno de los principales mecanismos de adaptación utilizados por las plantas bajo temperaturas extremas (Wahid *et al.*, 2012, p. 141; Asthir, 2015, p. 207). Estos osmolitos están compuestos por diferentes metabolitos primarios, tales como: aminoácidos, polioles, metilaminas y azúcares (Khan, Ahmad, Ahmad y Kumar, 2010, p. 891).

Tomando de referencia lo previamente citado, es casi probable que el aumento en la concentración de los sólidos solubles totales a 45°C en las plantas estresadas de forma directa, se deba a una acumulación de estos osmolitos. Se reportan varias investigaciones que sustentan esta suposición. En *Vigna aconitifolia*, por ejemplo, se encontró un súbito incremento de 10.75 a 1075% de prolina y 227.34% de azúcares totales en muestras tratadas a 42°C (Harsh *et al.*, 2016, pp 4-5). *Triticum turgidum* también exhibió un incremento de sucrosa y

glicerol a 37°C pp. (Leonardis *et al.*, 2015, pp. 30385-30386). Así también, Li (2015, pp. 1-2) reportó en *Zea mays* una significativa acumulación de prolina, betaina y trehalosa como resultado de una termo tolerancia adquirida.

La razón por la que quizá se registró un aumento significativo de estos solutos compatibles en las muestras del estrés directo a 45°C, yacería en que únicamente en este tratamiento se evidenció una severa deshidratación en los tejidos, pérdida de turgencia y senescencia foliar (Figura 4f-g-h-i). Estos efectos descritos son provocados por una pérdida excesiva de agua y un desbalance osmótico (Prasad y Staggenborg, 2008, pp. 468-469; Wahid *et al.*, 2012, p. 141). Se sabe que frente a estas condiciones estresantes los osmolitos ayudan a mantener el balance hídrico de los tejidos, controlan el ajuste osmótico, regulan la estabilidad de las membranas, amortiguan el potencial redox de la célula, e incluso protegen a las estructuras proteicas (Singh *et al.*, 2011, pp. 1-2; Bitá y Gerats, 2013, p. 7; Awasthi, Bhandari y Nayyar, 2014, p.10). Por lo tanto, esta podría ser la razón por la cual se observó una mayor concentración de los sólidos solubles totales solo en el experimento de estrés directo, ya que en el de estrés gradual las plántulas no manifestaron senescencia ni desecación foliar. Por consiguiente, cabría inferir que ante un estrés gradual *V. pubescens* no incrementa la síntesis de los solutos compatibles, sino más bien sus mecanismos de defensa se basan en acumular otros componentes como las HSP y enzimas antioxidantes, descritos anteriormente.

Otros compuestos implicados en el estrés térmico que pudieron haber atribuido una mayor concentración de sólidos solubles serían las fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), las auxinas y giberelinas; así como otros metabolitos secundarios: antocianinas, carotenoides, isoprenoides, flavonoides, fenoles, brasinoesteroides y tocoferoles (Wahid *et al.*, pp. 142-143; Bitá y Gerats, 2013, p. 3; Trivedi, 2015, pp. 153, 156).

### **5.5 Oxidación relativa de los componentes solubles en *V. pubescens***

La medida relativa de grupos carbonilos constituye un método cuantitativo que permite conocer los niveles de oxidación de las moléculas solubles, principalmente las proteínas. Estos grupos carbonilos se forman a partir de un

proceso irreversible denominado carbonilación, en donde las especies reactivas de oxígeno (ROS) reaccionan con los compuestos solubles modificando sus estructuras, lo cual conlleva a una pérdida de función de estas moléculas que al final se traduce en un estado oxidativo celular (Suzuki, Carini y Butterfield, 2010, pp. 323-324).

En este trabajo de investigación las muestras foliares inducidas a un estrés térmico directo y/o gradual mostraron un aumento en la concentración de los grupos carbonilo, lo que significa, que el choque térmico provocó un daño oxidativo sobre los compuestos solubles foliares en ambos experimentos (Figuras 8 y 14). De acuerdo a la bibliografía revisada, las proteínas forman parte de los componentes solubles más vulnerables ante los procesos de oxidación, de hecho representan hasta un 68% de las moléculas oxidadas en la célula (Anjum *et al.*, 2015, p. 4109). Por consiguiente, cabría decir que los altos niveles de oxidación obtenidos en el presente estudio reflejan en mayor parte, un daño oxidativo proteico. Estos resultados son consistente con otros reportes, donde se menciona que varios tipos de estreses abióticos han inducido un aumento en el contenido de los grupos carbonilo (Gill y Tuteja, 2010, p. 915). En *Oryza sativa*, por ejemplo, se observó un notable incremento de carbonilación de proteínas como resultado de un déficit hídrico (Pyngrope, Bhoomika, Dubey, 2012, pp. 7-8). Cabe mencionar que la reducción en el contenido de agua y en general, el estatus hídrico, son también consecuencia del estrés térmico (Wahid *et al.*, 2012, p. 141). En otro análisis, elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> (un gas que produce incrementos en los niveles de temperatura) provocaron como respuesta un significativo aumento en la concentración de grupos carbonilo en hojas de *A. thaliana* y *Glycine max* (soya) (Qiu *et al.*, 2008, pp. 159-160). Asimismo, Ding y colaboradores (2012, pp. 3261-3262) obtuvieron como resultado una acumulación de proteínas carboniladas en las hojas de *Solanum lycopersicum* luego de haber inducido a las plantas por 2 y 4 horas a una temperatura de 42°C.

Pese a que la concentración de carbonilos incrementó independientemente del tipo de ensayo térmico, directo o gradual, si se observó notables diferencias entre ambos tratamientos. Por ejemplo, en el ensayo de estrés gradual las muestras del tratamiento térmico a 33.5°C no presentaron una diferencia estadísticamente

significativa respecto del control, mientras que a 45°C se presencié un aumento en la oxidación de los compuestos solubles de un 52.5% (Figura 14). Estos datos difieren con los del ensayo de estrés directo, en los cuales se reportó un mayor incremento en los niveles de carbonilación de un 81% y 198% para 33.5 y 45°C, respectivamente (Figura 8). Al relacionar esta información, es razonable aludir que el grado de afectación que tuvo el estrés térmico directo sobre las plántulas de *V. pubescens* fue mucho mayor que al inducirse un incremento de temperatura de forma gradual. Esta respuesta pudo suscitarse debido a que ante un estrés gradual *V. pubescens* logra un cierto grado de aclimatación promoviendo un mejor mecanismo de defensa, el cual estaría vinculado con la síntesis de las HSP y los sistemas antioxidantes; mientras que frente a un choque térmico directo los mecanismos defensivos de *V. pubescens* no fueron los más óptimos, por lo que subsecuentemente se propició un mayor daño oxidativo. Esta inferencia concordaría con el mayor contenido proteico presenciado en las muestras del estrés gradual a 33.5°C (Figura 12).

En base a la información consultada se sabe que las HSP al actuar como chaperonas ayudan a dirigir las proteínas degradadas o carboniladas en este caso, hacia los sistemas proteolíticos; además, participan en el re-plegamiento de las proteínas mal plegadas, previenen que otros metabolitos se oxiden y evitan que las moléculas carboniladas se aglomeren (Hasanuzzaman *et al.*, 2013b, p. 9664; Usman *et al.*, 2014, pp. 204-205; Asthir, 2015, p. 206). Los sistemas antioxidantes, tales como enzimas y otros metabolitos antioxidantes también participan en los mecanismos de defensa, explícitamente removiendo y eliminando los ROS que son causantes de la carbonilación (Bita y Gerats, 2013, p. 8; Awasthi *et al.*, 2015, p.2). Por tanto, las HSP al igual que las enzimas antioxidantes pueden explicar por qué existe un menor daño oxidativo en las muestras del estrés gradual, suponiendo desde luego, que el incremento proteico y el menor daño oxidativo en los ensayos de estrés térmico progresivo se deban a estas proteínas.

Los altos niveles de carbonilación proteica observados en el ensayo de estrés directo, también podrían explicarse desde un punto de vista fenotípico. Anteriormente, se explicó que las plántulas inducidas a un estrés térmico directo



exhibieron senescencia foliar (Figura 4f-g-h-i), mientras que las del estrés gradual solo agudas lesiones. En la literatura revisada se encontró un reciente análisis publicado por Havé, Leitao, Bagard, Castell y Repellin (2015, pp. 975-976), quienes observaron que en hojas senescentes de *Triticum aestivum*, las proteínas carboniladas se incrementaron considerablemente. Asimismo, según lo reportado por Vanacker y colaboradores (2006, pp. 1738-1739), las muestras foliares senescentes de *Pisum sativum* también presentaron altos niveles de carbonilación. Estas investigaciones, por tanto, darían cabida para inferir que las muestras del estrés térmico directo al exhibir senescencia foliar presentaron altos niveles de los grupos carbonilo, en contraste con las muestras del estrés térmico gradual, las cuales no exhibieron senescencia foliar y como resultado presentaron un menor daño oxidativo en sus compuestos solubles.

#### **5.6 Oxidación relativa de lípidos en *V. pubescens***

La peroxidación de lípidos imparte un significativo daño sobre la célula de los organismos (Ayala *et al.*, 2014, p. 2). El malondialdehído (MDA) forma parte de uno de los productos secundarios de dicha oxidación lipídica (Anjum *et al.*, 2015, p. 4102). Este compuesto reacciona con el ácido tiobarbitúrico formando productos colorimétricos catalogados como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés) (Asthir, 2015, p. 203). La medida de estas sustancias permite conocer el grado de oxidación de los componentes lipídicos y a la par, inferir el daño provocado sobre las membranas biológicas (Labbuda, 2013, pp. 5-7).

Las muestras foliares en este estudio al ser inducidas a un choque térmico directo exhibieron un incremento significativo en la concentración de MDA proporcional al aumento de temperatura (Figura 10). Se sabe que el estrés térmico incrementa el contenido de MDA conllevando a una seria afectación sobre la fluidez de la membrana y la estructura de la bicapa lipídica (Asthir, 2015, p. 203). Por lo que se puede afirmar que ante un estrés abrupto de temperatura, específicamente a 33.5 y 45°C, las membranas biológicas de *V. pubescens* son seriamente afectadas. Los resultados obtenidos son coherentes con los análisis reportados por otros ensayos. En un anterior estudio realizado por Kipp y Boyle

(2013, p. 22) las plantas de *A. thaliana* sometidas por 12 horas a una temperatura de 29°C/23°C (día/noche) manifestaron un 68.30% de aumento en la concentración de MDA respecto al grupo control 23°C/23°C (día/noche). El genotipo IR-6 de *O. sativa* también presentó la mayor cantidad de MDA luego de inducirse a las plantas por 72 horas a una temperatura de 42°C (Ali, Azhar, Galani, 2013, p. 14). De igual manera, los coleóptilos de *T. aestivum* al ser expuestos a un tratamiento térmico de 42°C por un periodo de 24 horas exhibieron un incremento en la oxidación lipídica (Savicka y Škute, 2012, pp. 13-15). El doble de contenido de MDA se observó en la misma especie luego de 20 horas de inducidas las plantas a 45°C (Hameed *et al.*, 2012, p. 287). Asimismo, las hojas de *Lactuca sativa* (lechuga) presentaron un incremento de MDA de un 50.7% y 97.49% para las variedades S24 y S39, respectivamente al someterse a un régimen térmico de 42/37°C (día/noche) por 12 horas (Han, Fan, Zhang y Wang, 2013, pp. 112-113).

Por otra parte, las concentraciones de MDA correspondientes a las muestras del ensayo térmico de estrés gradual indican que los niveles de oxidación de los lípidos no tuvieron un incremento significativo (Figura 15). Estos resultados señalan que probablemente, al incrementarse gradualmente la temperatura *V. pubescens* adquiere una resistencia al estrés térmico, respondiendo con un mejor arsenal de respuestas, que mitigaron de cierta forma los daños oxidativos en los componentes lipídicos. Esta respuesta concuerda con lo observado en la leguminosa *Vigna radiata*, donde las plántulas pre tratadas por 1 hora a una temperatura de 40°C seguido de una temperatura extrema de 50°C por 2 horas, presentaron un reducido contenido de MDA a diferencia de las plantas tratadas directamente a 50°C (Mansoor y Naqvi, 2013, pp. 3198-3199). En un reciente reporte, luego de un estrés térmico se comparó el contenido de MDA en la especie *Paeonia lactiflora*, entre una variedad termo resistente (Zifengyu) y una variedad moderadamente resistente (Hongyanzhenghui), el respectivo ensayo mostró que la variedad termo resistente exhibió menores niveles de oxidación lipídica en contraste con la variedad menos resistente (Wu, Zhao, Han y Tao, 2016, p. 478). Un bajo contenido de MDA también se reportó luego de someter

las plántulas de *G. hirsutum* a un estrés gradual de 38 y 45°C (Gur *et al.*, 2010, pp. 1010-1011).

Por otro lado, resulta razonable inferir que el aumento en la concentración de proteínas (Figura 12), discutido anteriormente, pudo ayudar a mantener estables los niveles de MDA en las muestras del ensayo de estrés gradual. Concretamente, esta respuesta tal vez se deba a la acción de las HSP, ya que se ha visto que una de sus funciones es proteger a las membranas lipídicas de la oxidación (Usman *et al.*, 2014, pp. 207-208). De hecho, se conoce que algunas pequeñas HSP (sHSP) logran unirse a las membranas biológicas formando lípidos de choque térmico, los cuales han sido capaces de estabilizar las membranas durante los incrementos de temperatura (Bita y Gerats, 2013, p. 8). En un interesante artículo publicado por Ahn y Zimmerman (2006, pp. 97-98) se obtuvo una respuesta positiva al transferir el gen *DcHSP17.7* codificante de la proteína HSP17.7 de *Daucus carota* (zanahoria) a *Solanum tuberosum* (papa), los autores observaron que la expresión constitutiva de dicho gen en *S. tuberosum* potenció la estabilidad de las membranas biológicas frente a las altas temperaturas.

Las enzimas y otras moléculas antioxidantes también pudieron haber mantenido estables los niveles de MDA, debido a que se ha encontrado que a mayores concentraciones de los sistemas antioxidantes los niveles de MDA tienden a decrecer (Awasthi *et al.*, 2014, pp. 7-9).

### **5.7 Respuesta fisiológica luego del estrés térmico progresivo en *V. pubescens***

Los tratamientos de recuperación (45 a ~25°C) de los experimentos de estrés gradual no mostraron ningún cambio estadísticamente significativo en comparación con el tratamiento a 45°C, ni tampoco valores de concentración similares al control en ninguno de los parámetros aquí evaluados (contenido de proteínas, concentración de carbonilos, sólidos solubles y contenido de MDA). De hecho, en el ensayo de oxidación de compuestos solubles existió un incremento de 71% en la concentración de carbonilos con respecto al control (Figura 14). Además, cabe recalcar que aunque estadísticamente los valores de

MDA del tratamiento de recuperación no difirieron de los del control, los datos obtenidos si mostraron un 51% de incremento de MDA en relación a las muestras que se mantuvieron a temperatura ambiente (Figura 15). En otras palabras, no se evidenció una recuperación o restablecimiento significativo en los parámetros analizados.

Existe la posibilidad de que el tiempo asignado de recuperación (72 horas) haya sido insuficiente para notar un cambio o restablecimiento fisiológico en *V. pubescens*. Esta lenta recuperación podría ser una característica propia de esta especie, puesto que en *V. vinifera* si se evidenció una reducción en el contenido de MDA luego de que las plántulas se dejaron en recuperación por 18 horas, al haber salido previamente de un estrés de 43°C por 6 horas (Liu *et al.*, 2014, p. 3).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

A nivel fenotípico, las plántulas de *V. pubescens* inducidas a un estrés por incremento directo de temperatura, muestran un grave daño anatómico a 45°C. En cambio, las plántulas sometidas a un estrés térmico por incremento gradual de temperatura, presentan solo leves lesiones sobre sus tejidos.

Es probable que *V. pubescens* logre adquirir un cierto grado de termo resistencia al incrementarse de forma gradual la temperatura. Este comportamiento se refleja en el mayor contenido de proteínas sintetizadas, posiblemente las HSP, enzimas antioxidantes y otros metabolitos relacionados con la tolerancia al estrés térmico. Además, los daños oxidativos sobre los compuestos solubles son menores y los lípidos no manifiestan una aparente oxidación.

La especie *V. pubescens* es susceptible a un choque térmico directo de 45°C y como consecuencia presenta un mayor nivel de oxidación tanto en sus compuestos solubles como en los componentes lipídicos. Asimismo, es probable que sus mecanismos de adaptación en contra de este tipo de estrés no respondan con eficiencia, por lo que no fue capaz de incrementar el contenido de proteínas en respuesta al estrés térmico. Aunque, aparentemente acumula osmolitos que ayudarían a mitigar el desbalance osmótico y la deshidratación del tejido foliar.

Los cambios fisiológicos observados en *V. pubescens* posterior al estrés gradual inducido, no exhiben un restablecimiento a los niveles normales respecto al control durante la fase de recuperación (72 horas). Esto puede deberse a que quizá esta especie exhiba una recuperación lenta en su fisiología luego de producirse un aumento de temperatura.

## 6.2 Recomendaciones

Aunque en la presente investigación se documenta los niveles oxidativos de los compuestos solubles, los mismos no pertenecen específicamente a proteínas. Por ello, se recomienda evaluar la oxidación específicamente de proteínas por medio de técnicas de inmunodetección Western-Blot y/o ELISA y así discriminar la determinación oxidativa solo a nivel proteico.

Identificar si el aumento de concentración proteica encontrada en las muestras foliares correspondiente a los experimentos de estrés térmico progresivo, se debe efectivamente a las proteínas de choque térmico (HSP) y a las enzimas antioxidantes. Así también, corroborar si la supuesta acumulación de los osmolitos en las muestras sometidas a un estrés directo de temperatura (45°C), corresponde realmente a esos metabolitos primarios.

Incorporar un tratamiento de recuperación (45 a ~25°C) al ensayo de estrés térmico directo. Además, extender el tiempo de duración de este ensayo en ambos tipos de estrés directo y/o gradual a ~120 horas, para así evaluar y contrastar todas las variables aquí medidas respecto al tratamiento de 45°C y el control.

Inducir nuevamente a las mismas plántulas de *V. pubescens* a un segundo estrés térmico directo y/o gradual, para con ello analizar si el daño oxidativo incrementa o caso contrario decrece. Esto permitiría determinar que la especie en estudio adquiere realmente tolerancia al aumento de temperatura, si previamente es inducida a dicho estrés.

Analizar el estrés oxidativo ocasionado por el aumento de temperatura en otros tejidos, principalmente en raíces, ya que se conoce que en muchas plantas esta parte estructural es seriamente afectada por la temperatura.

Por último, se recomienda evaluar en *V. pubescens* el daño oxidativo generado por el incremento de temperatura combinado con otro tipo de estreses abióticos, debido a que en condiciones normales los factores abióticos como: temperatura, salinidad y déficit hídrico casi siempre se presentan simultáneamente.

## 7. REFERENCIAS

- Abdallah, N. Moses, V. y Prakash, C. (2014). The impact of possible climate changes on developing countries. *GM Crops & Food*, 5(2), 77–80. Recuperado el 20 de Agosto de 2016 de <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/gmcr.32208>
- Acosta, A. y Hernández, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1), 34-44. Recuperado el 14 de Mayo de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43290105>
- Acosta, J., Bentivegna, D., Panigo, E., Dellaferrera, I. y Perreta, M. (2013). Factors affecting seed germination and emergence of *Gomphrena perennis*. *Weed Research*, 53(1), 69–75. Recuperado el 15 de Mayo de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3180.2012.00954.x/pdf>
- Ahn, Y. y Zimmerman, J. (2006). Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro. *Plant, Cell & Environment*, 29(1), 95–104. Recuperado el 12 de Junio de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2005.01403.x/epdf>
- Aldini, G., Domingues, M., Spickett, C., Domingues, P., Altomare, A., Sánchez-Gómez, F., ... Pérez-Sala, D. (2015). Protein lipoxidation: Detection strategies and challenges. *Redox Biology*, 5(1), 253–266. Recuperado el 15 de Mayo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000464>
- Ali, M., Azhar, A. y Galani, S. (2013). Response of rice (*Oryza sativa* L.) under elevated temperature at early growth stage: physiological markers. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 8(20), 11–19. Recuperado el 03 de Junio de 2016 de <http://cyberleninka.ru/article/n/response-of-rice-oryza-sativa-l-under-elevated-temperature-at-early-growth-stage-physiological-markers>

- Al-Wahaibi, M. (2011). Plant heat-shock proteins: A review. *Journal of King Saud University Science*, 23(2), 139-150. Recuperado el 18 de Mayo de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/228674830\\_Plant\\_heat-shock\\_proteins\\_A\\_mini\\_review](https://www.researchgate.net/publication/228674830_Plant_heat-shock_proteins_A_mini_review)
- Anjum, N., Sofo, A., Scopa, A., Roychoudhury, A., Gill, S., Iqbal, M., ... Ahmad, I. (2015). Lipids and proteins-major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4099–4121. Recuperado el 22 de Abril de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3917-1>
- Ashmore, S., Drew, R. y Azimi, M. (2007). Vitrification-based shoot tip cryopreservation of *Carica papaya* and a wild relative *Vasconcellea pubescens*. *Australian Journal of Botany*, 55(5), 541–547. Recuperado el 28 de Abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1071/BT06144>
- Asthir, B. (2015). Mechanisms of heat tolerance in crop plants. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 202–210. Recuperado el 08 de Mayo de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10535-015-0539-5>
- Awasthi, R., Bhandari, K. y Nayyar, H. (2015). Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science*, 3(1), 1–24. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2015.00011/full>
- Ayala, A., Muñoz, M. y Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(1), 1-31. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
- Balbontín, C., Gaete-Eastman, C., Fuentes, L., Figueroa, C., Herrera, R., Manriquez, D., ... Moya-León, M. (2010). *VpAAT1*, a gene encoding an alcohol acyltransferase, is involved in ester biosynthesis during ripening of mountain papaya fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5114–5121. Recuperado el 21 de Marzo de 2016 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf904296c>



- Baraibar, M., Ladouce, R. y Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of Proteomics*, 92(1), 63–70. Recuperado el 14 de Marzo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391913002492>
- Battisti, D. y Naylor, R. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323(5911), 240–244. Recuperado el 14 de Agosto de 2016 de <http://www.homerdixon.com/wp-content/uploads/2012/07/Historic-Warnings-of-Future-Food-Insecurity-with-Unprecedented-Seasonal-Heat.pdf>
- Benítez, S., Lobo, M., Delgado, O. y Medina, C. (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(2), 187–197. Recuperado el 22 de Mayo de 2016 de <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/RevCorpoicaVol14-2cap05.pdf>
- Bilheiro, R., Braga, A., Filho, M., Carvalho-Tavares, J., Agero, U., Carvalho, M., ... Lopes, M. (2013). The thrombolytic action of a proteolytic fraction (P1G10) from *Carica candamarcensis*. *Thrombosis Research*, 131(4), e175–e182. Recuperado el 02 de Mayo de 2016 de <http://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848%2813%2900033-9/abstract>
- Bitá, C., y Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4(273), 7-18. Recuperado el 12 de Agosto de 2016 de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00273/full>
- Cadet, J., Douki, T. y Ravanat, J. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(1), 9–21. Recuperado el 12 de Marzo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584910002017>

- Carrasco, B., Avila, P., Perez-Diaz, J., Muñoz, P., García, R., Lavandero, B., ... Caligari, P. (2009). Genetic structure of highland papayas (*Vasconcellea pubescens* (Lenné et C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(3), 331–337. Recuperado el 20 de Agosto de 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10722-008-9367-1>
- Carvalho, F. (2015). *Molecular Phylogeny, Biogeography and an e-Monograph of the Papaya Family (Caricaceae) as an Example of Taxonomy in the Electronic Age*. Munich, Alemania: Springer Spektrum. Recuperado el 19 de Febrero de 2016 de <http://www.springer.com/us/book/9783658102661>
- Carvalho, F. y Renner, S. (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 46–53. Recuperado el 14 de Agosto de 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790312001972>
- Carvalho, F. y Renner, S. (2014) Drew, R., Kyndt, T. y Scheldeman, X. The Phylogeny of the Caricaceae (Cap 5). En Ming, R. y Moore, P.H. (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 10* (81-92). Nueva York, Estados Unidos: Springer Science Business Media. Recuperado el 17 de Agosto de 2015 de [https://www.researchgate.net/publication/278661471\\_The\\_Phylogeny\\_of\\_the\\_Caricaceae](https://www.researchgate.net/publication/278661471_The_Phylogeny_of_the_Caricaceae)
- Chhetri, N. y Chaudhary, P. (2011). Green Revolution: Pathways to food security in an era of climate variability and change? *Journal of Disaster Research*, 6(5), 486–497. Recuperado el 17 de Agosto de 2015 de <https://www.fujipress.jp/jdr/dr/dsstr000600050486/>
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Drew, R., Kyndt, T. y Scheldeman, X. *Vasconcellea* for papaya improvement (Cap 4). En Ming, R. y Moore, P.H. (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 10* (47-79). Nueva York, Estados

- Unidos: Springer Science Business Media. Recuperado el 09 de Agosto de 2015 de [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-8087-7\\_4](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-8087-7_4)
- Corrêa, N., Mendes, I., Gomes, M., Kalapothakis, E., Chagas, B., Lopes, M. y Salas, C. (2011). Molecular cloning of a mitogenic proteinase from *Carica candamarcensis*: Its potential use in wound healing. *Phytochemistry*, 72(16), 1947–1954. Recuperado el 17 de Abril de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942211003074>
- Criollo, H., Muñoz, J. y Portilla, P. (2004). Caracterización morfológica del chilacuán (*Vasconcellea cundinamarcensis*) en el municipio de Pasto, Departamento de Nariño. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 21(1-2), 1-16. Recuperado el 07 de Marzo de 2016 de <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/502>
- Ding, H., Zhang, H., Zhu, X., Liu, H., Liang, J. y Lu, B. (2012). Involvement of calcium and calmodulin signaling in adaptation to heat stress-induced oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. leaves. *African Journal of Biotechnology*, 11(14), 3259–3269. Recuperado el 07 de Mayo de 2016 de <http://www.ajol.info/index.php/ajb/issue/view/10858>
- Dittz, D., Figueiredo, C., Lemos, F., Viana, C., Andrade, S., Souza-Fagundes, E., ... Lopes, M. (2015). Antiangiogenesis, Loss of Cell Adhesion and Apoptosis Are Involved in the Antitumoral Activity of Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in Murine Melanoma B16F1. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7027–7044. Recuperado el 12 de Mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4425002/>
- Drew, R., Persley, D., O'Brien, C. y Bateson, M. (2005). Papaya ringspot virus in australia and the development of virus resistant plants. *Acta Horticulturae*, 692(1), 101–106. Recuperado el 04 de Abril de 2016 de [http://www.lib.teiep.gr/images/stories/acta/Acta%20692/692\\_12.pdf](http://www.lib.teiep.gr/images/stories/acta/Acta%20692/692_12.pdf)
- Du, Z. y Bramlage, W. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural*

- and Food Chemistry*, 40(1), 1566–1570. Recuperado el 14 de Agosto de 2016 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00021a018>
- Duarte, O. y Paull, R. (2015). *Exotic Fruits and Nuts of the New World*. El Zamarano, Honduras: Cabi Publishing.
- Dukić, N., Simin, N., Svirčev, E., Orčić, D., Beara, I., Lesjak, M. y Božin, B. (2012). The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway. En Catala, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation* (193–200). Estados Unidos: InTech. Recuperado el 14 de Abril de 2016 de <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/the-effect-of-plant-secondary-metabolites-on-lipid-peroxidation-and-eicosanoid-pathway>
- Ergin, S., Kesici, M. y Gulen, H. (2012). Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and peroxidase activities in strawberry plants under heat stress. *Harran Journal of Agricultural and Food Science*, 16(1), 25–35. Recuperado el 03 de Junio de 2016 de <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/harranziraat/article/view/1101000016>
- Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*. 14(9), 1-42. Recuperado el 16 de Agosto de 2015 de <http://www.jstatsoft.org/v14/i09/paper>
- Garzón, V., Rouimi, P., Jouanin, I., Waeg, G., Zarkovic, N., Villa-Treviño, S. y Guéraud, F. (2012). Evaluation of three simple direct or indirect carbonyl detection methods for characterization of oxidative modifications of proteins. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(4), 296–304. Recuperado el 16 de Mayo de 2016 de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15376516.2012.657258>
- Gill, S. y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. Recuperado el 06 de Abril de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942810001798>
- Gomes, F., Spínola, C., Ribeiro, H., Lopes, M., Cassali, G. y Salas, C. (2010). Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns*, 36(2), 277–

283. Recuperado el 06 de Abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2009.04.007>

- Gosavi, G., Jadhav, A., Kale, A., Gadakh, S., Pawar, B. y Chimote, V. (2014). Effect of heat stress on proline, chlorophyll content, heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) at seedlings stage. *Indian Journal of Biotechnology*, 13(3), 356–363. Recuperado el 28 de Mayo de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/267574473\\_Effect\\_of\\_heat\\_stress\\_on\\_proline\\_chlorophyll\\_content\\_heat\\_shock\\_proteins\\_and\\_antioxidant\\_enzyme\\_activity\\_in\\_sorghum\\_Sorghum\\_bicolor\\_at\\_seedlings\\_stage](https://www.researchgate.net/publication/267574473_Effect_of_heat_stress_on_proline_chlorophyll_content_heat_shock_proteins_and_antioxidant_enzyme_activity_in_sorghum_Sorghum_bicolor_at_seedlings_stage)
- Greer, D. y Weston, C. (2010). Heat stress affects flowering, berry growth, sugar accumulation and photosynthesis of *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevines grown in a controlled environment. *Functional Plant Biology*, 37(3), 206–214. Recuperado el 29 de Mayo de 2016 de <http://www.publish.csiro.au/fp/FP09209>
- Gulen, H. y Eris, A. (2004). Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*, 166(3), 739–744. Recuperado el 02 de Junio de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/233386878\\_Effect\\_of\\_heat\\_stress\\_on\\_peroxidase\\_activity\\_and\\_total\\_protein\\_content\\_in\\_strawberry\\_plants](https://www.researchgate.net/publication/233386878_Effect_of_heat_stress_on_peroxidase_activity_and_total_protein_content_in_strawberry_plants)
- Gür, A., Demirel, U., Özden, M., Kahraman, A. y Çopur, O. (2010). Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9(7), 1008–1015. Recuperado el 02 de Junio de 2016 de <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Hameed, A., Goher, M. y 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. Recuperado el 11 de Abril de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s00344-011-9238-4>
- Han, Y., Fan, S., Zhang, Q. y Wang, Y. (2013). Effect of heat stress on the MDA,

- proline and soluble sugar content in leaf lettuce seedlings. *Agricultural Sciences*, 04(05), 112–115. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de <http://file.scirp.org/Html/34616.html>
- Harsh, A., Sharma, Y., Joshi, U., Rampuria, S., Singh, G., Kumar, S. y 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. Recuperado el 11 de Junio de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178316300021>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. y Fujita, M. (2013a). Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants (Cap 6). En Vahdati, K. y Leslie, C. (Eds.), *Plants, Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture* (169–205). Estados Unidos: InTech. Recuperado el 15 de Agosto de 2015 de <http://library.umac.mo/ebooks/b28045634.pdf>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R. y Fujita, M. (2013b). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643–9684. Recuperado el 20 de Agosto de 2015 de <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/5/9643>
- Hatfield, J. y Prueger, J. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10(1), 4–10. Recuperado el 20 de Mayo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212094715300116>
- Havé, M., Leitaó, L., Bagard, M., Castell, J. y Repellin, A. (2015). Protein carbonylation during natural leaf senescence in winter wheat, as probed by fluorescein-5-thiosemicarbazide. *Plant Biology*, 17(5), 973–979. Recuperado el 05 de Julio de 2016 de <https://iees-paris.ufr918.upmc.fr/images/publi/8e64d24c595fa4c728d609ccfc9ff9e6.pdf>
- He, Y., Liu, X. y Huang, B. (2005). Protein Changes in Response to Heat Stress in Acclimated and Nonacclimated Creeping Bentgrass. *Journal of the*

- American Society for Horticultural Science*, 130(4), 521–526. Recuperado el 03 de Junio de 2016 de <http://journal.ashspublications.org/content/130/4/521.abstract>
- Hendricks, N. y Peterson, J. (2014). Economic damages to agriculture from temperature increases decomposing effects of heat exposure and water stress. Recuperado el 25 de Abril de 2016 de [www.afre.msu.edu/uploads/files/AFRE.../Hendricks\\_Paper.pdf](http://www.afre.msu.edu/uploads/files/AFRE.../Hendricks_Paper.pdf)
- Hossain, M., Bhattacharjee, S., Armin, S., Qian, P., Xin, W., Li, H., ... Tran, L. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6(420), 1-19. Recuperado el 25 de Abril de 2016 de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00420/full>
- INIAP. (2003). Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae-Solanaceae, fenología, usos y recolección de germoplasma en el sur del Proyecto iqcv045. Recuperado el 20 de Agosto de 2016 de [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/INFORMEDIVERSIDAD\\_FRUTALES\\_NATIVOS\\_COMESTIBLES\\_CARICACEAE\\_SOLANACEAE\\_FENOLOGIA\\_USOS\\_RECOLECCION\\_GERMOPLASMA\\_SUR\\_ECUADOR.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/INFORMEDIVERSIDAD_FRUTALES_NATIVOS_COMESTIBLES_CARICACEAE_SOLANACEAE_FENOLOGIA_USOS_RECOLECCION_GERMOPLASMA_SUR_ECUADOR.pdf)
- IPCC. (2007). *Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability: contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel. Ginebra*. Recuperado el 23 de Abril de 2016 de [https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg2/ar4\\_wg2\\_full\\_report.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg2/ar4_wg2_full_report.pdf)
- Jha, U., Bohra, A. y Singh, N. (2014). Heat stress in crop plants: Its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. *Plant Breeding*, 133(6), 679–701. Recuperado el 17 de Abril de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbr.2014.133.issue-6/issuetoc>
- Joshi, R. y Chinnusamy, V. (2014). Antioxidant Enzymes: Defense against High Temperature Stress (Cap 12). En Ahmad, P. (Ed.), *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (369-396). Estados

- Unidos: Academic Press. Recuperado el 19 de Abril de 2016 de <http://www.doi.10.1016/B978-0-12-799963-0.00012-5>
- Kesici, M., Gulen, H., Ergin, S., Turhan, E., Ipek, A. y Koksall, N. (2013). Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 244–249. Recuperado el 07 de Junio de 2016 de <http://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9009>
- Khan, S., Ahmad, N., Ahmad, F. y Kumar, R. (2010). Naturally occurring organic osmolytes: From cell physiology to disease prevention. *IUBMB Life*, 62(12), 891–895. Recuperado el 04 de Julio de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.406/epdf>
- Kipp, E. y Boyle, M. (2013). The effects of heat stress on reactive oxygen species production and chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Research in Plant Sciences*, 1(2), 20–23. Recuperado el 29 de Junio de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/272092534\\_The\\_Effects\\_of\\_Heat\\_Stress\\_on\\_Reactive\\_Oxygen\\_Species\\_Production\\_and\\_Chlorophyll\\_Concentration\\_in\\_Arabidopsis\\_Thaliana](https://www.researchgate.net/publication/272092534_The_Effects_of_Heat_Stress_on_Reactive_Oxygen_Species_Production_and_Chlorophyll_Concentration_in_Arabidopsis_Thaliana)
- Kumar, R., Goswami, S., Sharma, S., Singh, K., Gadpayle, K., Kumar, N., Rai, G., Singh, M. y Rai, R. (2012). Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and transcript of heat shock protein. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4(4), 83–91. Recuperado el 17 de Mayo de 2016 de [http://www.academicjournals.org/article/article1380098958\\_Kumar%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380098958_Kumar%20et%20al.pdf)
- Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J., Gheysen, G. y Goetghebeur, P. (2005). Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *American Journal of Botany*, 92(6), 1033–1044. Recuperado el 25 de Agosto de 2016 de <http://www.amjbot.org/content/92/6/1033>
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Haegeman, A., Roldán-Ruiz, I. y Gheysen, G. (2006). Cross-species microsatellite amplification in *Vasconcellea* and



- related genera and their use in germplasm classification. *Genome National Research Council Canada*, 49(7), 786–798. Recuperado el 25 de Agosto de 2016 de <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/g06-035>
- Labudda, M. (2013). Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. Recuperado el 21 de Marzo de 2016 de: <http://www.e-wydawnictwo.eu/Document/DocumentPreview/3342>
- Laily, A., Suranto y Sugiyarto. (2012). Characterization of *Carica pubescens* in Dieng Plateau, Central Java based on morphological characters, antioxidant capacity, and protein banding pattern. *Nusantara Bioscience*, 4(1), 16–21. Recuperado el 21 de Marzo de 2016 de <http://biosains.mipa.uns.ac.id/N/N0401/N040104.pdf>
- Lemos, F., Ferreira, L., Cardoso, V., Cassali, G., Salas, C. y Lopes, M. (2011). Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. *European Journal of Dermatology*, 21(5), 722–730. Recuperado el 23 de Abril de 2016 de <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/ejd.2011.1466>
- Lemos, F., Villalba, M., Tagliati, C., Cardoso, V., Salas, C. y Lopes, M. (2016). Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(1), 94–101. Recuperado el 21 de Abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.008>
- Leonardis, A., Fragasso, M., Beleggia, R., Ficco, D., de Vita, P. y Mastrangelo, A. (2015). Effects of Heat Stress on Metabolite Accumulation and Composition, and Nutritional Properties of Durum Wheat Grain. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30382–30404. Recuperado el 03 de Mayo de 2016 de <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/12/26241>
- Li, Z. (2015). Synergistic effect of antioxidant system and osmolyte in hydrogen sulfide and salicylic acid crosstalk-induced heat tolerance in maize

- (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, 10(9):e1051278, 1-4. Recuperado el 05 de Julio de 2016 de <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15592324.2015.1051278>
- Lichtenberg, D. y Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(3), 441–444. Recuperado el 05 de Mayo de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A. y Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review. *International Agrophysics*, 27(4), 463–477. Recuperado el 15 de Mayo de 2016 de <https://www.degruyter.com/view/j/intag.2013.27.issue-4/intag-2013-0017/intag-2013-0017.xml>
- Liu, G., Ma, L., Duan, W., Wang, B., Li, J., Xu, H., .....Wang, L.(2014). Differential proteomic analysis of grapevine leaves by iTRAQ reveals responses to heat stress and subsequent recovery. *BMC Plant Biology*, 14(1):110, 1-17. Recuperado el 13 de Julio de 2016 de <https://bmcpantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-14-110>
- Liu, J., Feng, L., Li, J. y He, Z. (2015). Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Frontiers in Plant Science*, 6(267), 1-21. Recuperado el 13 de Mayo de 2016 de <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00267/full>
- Lobell, D., Schlenker, W. y Costa-Roberts, J. (2011). Climate trends and global crop production since 1980. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6042), 616–620. Recuperado el 13 de Agosto de 2015 de <http://science.sciencemag.org/content/333/6042/616>
- Lushchak, V. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224(10), 164–175. Recuperado el 23 de Abril de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279714003044>
- Lushchak, V., Stefanyk, V., National, P. y Stefanyk, V. (2014). Review article : Classification of oxidative stress. *EXCLI Journal*, 13(1), 922–937.

Recuperado el 28 de Abril de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464080/>

- Madian, A. y Regnier, F. (2010). Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites, *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3766–3780. Recuperado el 02 de Mayo de 2016 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr1002609>
- Mansoor, S. y Naqvi, F. (2013). Effect of heat stress on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mung bean (*Vigna radiata* L) seedlings, *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3196–3203. Recuperado el 12 de Junio de 2016 de <http://www.academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/C7F150925352>
- Mello, V., Gomes, M., Lemos, F., Delfino, J., Andrade, S., Lopes, M. y Salas, C. (2008). The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, 15(4), 237–244. Recuperado el 12 de Marzo de 2016 de <http://europepmc.org/abstract/med/17689943>
- Mittler, R., Finka, A. y Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118–125. Recuperado el 17 de Febrero de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007>
- Morales, A., Medina, D. y Yaguache, B. (2004). Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus *Vasconcellea* in Southern Ecuador. *Lyonia a Journal of Ecology and Application*, 7(2), 1–14. Recuperado el 09 de Febrero de 2016 de <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.241.1>
- Moya-León, M., Moya, M. y Herrera, R. (2004). Ripening of mountain papaya (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. *Postharvest Biology and Technology*, 34(2), 211–218. Recuperado el 21 de Marzo de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/222434209\\_Ripening\\_of\\_mountain\\_papaya\\_Vasconcellea\\_pubescens\\_and\\_ethylene\\_dependence\\_of\\_some\\_ripening\\_events](https://www.researchgate.net/publication/222434209_Ripening_of_mountain_papaya_Vasconcellea_pubescens_and_ethylene_dependence_of_some_ripening_events)
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C. y Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112(1), 33–53. Recuperado el 14 de

Abril de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942214003653>

- Noriega, P., Calero, D., Larenas, C., Maldonado, M. y Finzi, P. (2014). Componentes volátiles de los frutos de *Vasconcellea pubescens* A. DC. y *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (Kunth) usando la metodología HS-SPME-GC/MS. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 19(1), 5–11. Recuperado el 14 de Marzo de 2016 de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8847/1/Componentes%20volatiles%20de%20los%20frutos%20de%20Vasconcellea%20pubescens.pdf>
- Okunlola, G. y Adelusi, A. (2013). Effect of Prior Heat Stress on the Early Growth of *Carica papaya*, *Notulae Scientia Biologicae*, 5(4), 508–512. Recuperado el 18 de Junio de 2016 de <http://notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/view/9149>
- Oliver, C., Ahn, B., Moerman, E., Goldstein, S. y Stadtman, E. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5488–5491. Recuperado el 18 de Agosto de 2016 de <http://www.jbc.org/content/262/12/5488.full.pdf>
- Pecinka, A. y Mittelsten Scheid, O. (2012). Stress-induced chromatin changes: A critical view on their heritability. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 801–808. Recuperado el 18 de Abril de 2016 de <http://pcp.oxfordjournals.org/content/early/2012/03/28/pcp.pcs044>
- Permatasari, A., Sugiyarto, Marsusi. y Hailu, H. (2015). Transplantation of carica (*Vasconcellea pubescens*) at various altitudes of Mount Lawu, Central Java with treatment of shade and different types of fertilizers. *Nusantara Bioscience*, 7(1), 6–14. Recuperado el 19 de Abril de 2016 de <http://biosains.mipa.uns.ac.id/N/N0701/N070102.pdf>
- Poljsak, B., Šuput, D. y Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1-11. Recuperado el 22 de Abril de 2016 de <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/956792/>

- Prasad, P., Staggenborg, S. y Ristic, Z. (2008). Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants (Cap 11). En Ahuja, L., Reddy, V., Saseendran, S. y Yu, Q. (Eds.), *Response of Crops to Limited Water: Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes. Advances in Agricultural Systems Modeling Series 1* (301–356). Estados Unidos: ASA-CSSA-SSSA. Recuperado el 22 de Abril de 2016 de <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/advancesinagric/responseofcrops/301>
- Pyngrope, S., Bhoomika, K. y Dubey, R. (2013). Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in Indica rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 69(2), 149–165. Recuperado el 05 de Mayo de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10725-012-9758-3>
- Qiu, Q., Huber, J., Booker, F., Jain, V., Leakey, A., Fiscus, E., ... Huber, S. (2008). Increased protein carbonylation in leaves of *Arabidopsis* and soybean in response to elevated [CO<sub>2</sub>]. *Photosynthesis Research*, 97(2), 155–166. Recuperado el 11 de Julio de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11120-008-9310-5>
- Qu, A., Ding, Y., Jiang, Q. y Zhu, C. (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(2), 203–207. Recuperado el 11 de Marzo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X13001940>
- Rahayu, E., Habibah, N. y Herlina, L. (2015). Development of *in vitro* conservation medium of *Carica pubescens* Lenne & K. Koch through nutrients concentration reduction and osmoregulator addition. *Biosaintifika Journal of Biology & Biology Education*, 7(1), 22-28. Recuperado el 24 de Abril de 2016 de [http://journal.unnes.ac.id/artikel\\_nju/biosaintifika/3538](http://journal.unnes.ac.id/artikel_nju/biosaintifika/3538)
- Repetto, M., Semprine, J. y Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: Chemical

- Mecanism, Biological implications and analytical Determination (Cap 1). En Catala, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation* (3-30). Estados Unidos: InTech. Recuperado el 07 de Mayo de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/279418997\\_Lipid\\_Peroxidation\\_Chemical\\_Mechanism\\_Biological\\_Implications\\_and\\_Analytical\\_Determination](https://www.researchgate.net/publication/279418997_Lipid_Peroxidation_Chemical_Mechanism_Biological_Implications_and_Analytical_Determination)
- Savicka, M. y Škute, N. (2012). Some morphological, physiological and biochemical characteristics of wheat seedling *Triticum aestivum* L. organs after high-temperature treatment. *Ekologija*, 58(1), 9–21. Recuperado el 17 de Junio de 2016 de <http://www.lmaleidykla.lt/ojs/index.php/ekologija/article/view/2346>
- Scheldeman, X., Kyndt, T., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Ming, R., Drew, R., Droogenbroeck, B., Van Damme, P. y Moore, P. (2011). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources (Cap 11). En Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (213-249). Alemania, Berlin: Springer-Verlag. Recuperado el 17 de Agosto de 2015 de <http://www.springer.com/us/book/9783642143861>
- Scheldeman, X., Willemsen, L., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Romeijn-Peeters, E., Restrepo, M., 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. Recuperado el 23 de Agosto de 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10531-006-9086-x>
- Schieber, M. y Chandel, N. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. Recuperado el 05 de Marzo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055301/>
- Shahidi, F. y Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 1(3), 357–385. Recuperado el 15 de Abril de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/047167849X.bio050/compoundindex>

- Shulaev, V. y Oliver, D. (2006). Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research. *Plant Physiology*, 141(6), 367–372. Recuperado el 12 de Mayo de 2016 de <http://www.plantphysiol.org/content/141/2/367.full>
- Siddiq, M., Ahmed, J., Lobo, M. y Ozadali, F. (Eds.). (2012). *Tropical and Subtropical Fruits Processing and Packaging Tropical and Subtropical Fruits*. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Simirgiotis, M., Caligari, P. y 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. Recuperado el 22 de Abril de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/222426871\\_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](https://www.researchgate.net/publication/222426871_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)
- Singh, L., Poddar, N. y Dar, T. (2011). Forty years of research on osmolyte-induced protein folding and stability. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 8(1), 1–23. Recuperado el 13 de Julio de 2016 de <http://www.springerlink.com/index/V2561K817W563171.pdf>
- Singh, M., Kapoor, A. y Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-Biological Interactions*, 234(1), 261–273. Recuperado el 23 de Mayo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000927971400413X>
- Suzuki, Y., Carini, M. y Butterfield, D. (2010). Protein carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(3), 323–325. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821144/>
- Tai, A., Martin, M. y Heald, C. (2014). Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution. *Nature Climate Change*, 4(9), 817–821. Recuperado el 25 de Agosto de 2016 de <http://www.nature.com/nclimate/journal/v4/n9/full/nclimate2317.html>

- Tamarit, J., de Hoogh, A., Obis, E., Alsina, D., Cabiscol, E. y Ros, J. (2012). Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *Journal of Proteomics*, 75(12), 3778–3788. Recuperado el 26 de Mayo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912002679>
- Tapia, C., Zambrano, E. y Monteros, A. (2008). Informe Nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias [INIAP]. Recuperado el 27 de Agosto de 2015 de <https://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Ecuador.pdf>
- Teixeira, E., Fischer, G., Van Velthuisen, H., Walter, C. y Ewert, F. (2013). Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170(1), 206–215. Recuperado el 14 de Mayo de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/251524592\\_Global\\_hotspots\\_of\\_heat\\_stress\\_on\\_agricultural\\_crops\\_due\\_to\\_climate\\_change](https://www.researchgate.net/publication/251524592_Global_hotspots_of_heat_stress_on_agricultural_crops_due_to_climate_change)
- Teixeira, J., Rashid, Z., Tan, D., Dharini, N., Gera, A., Teixeira, M., ... Tennant, P. (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 1(1), 47–73. Recuperado el 30 de Abril de 2016 de <https://es.scribd.com/doc/146506876/2007-Papaya-Biology-and-Biotechnology>
- Teixeira, R., Ribeiro, H., Gomes, M., Lopes, M. y Salas, C. (2008). The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 956–961. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942808001125>
- Torres, K. y Obando, G. (2016). Rapid enzymatic disruption of *Enterococcus faecalis* biofilm using *Carica pubescens*: a pilot study. *Weber Medicine and Clinical Case Reports*, 2(1), 1–4. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de [http://www.weberpub.org/wmccr/wmccr\\_173.pdf](http://www.weberpub.org/wmccr/wmccr_173.pdf)
- Trivedi, A. (2015). Adaptations and Mechanisms of Heat Stress Tolerance of Plants. *Academic Research Journal of Agricultural Science and*



- Research*, 3(6), 151–160. Recuperado el 07 de Mayo de 2016 de [http://www.academicresearchjournals.org/ARJASR/PDF/2015/June/T\\_rivedi.pdf](http://www.academicresearchjournals.org/ARJASR/PDF/2015/June/T_rivedi.pdf)
- Uribe, E., Delgadillo, A., Giovagnoli-Vicuña, C., Quispe-Fuentes, I. y Zura-Bravo, L. (2015). Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 1–8. Recuperado el 04 de Mayo de 2016 de <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/347532/>
- Usman, M., Rafii, M., Ismail, M., Malek, M., Latif, M. y Oladosu, Y. (2014). Heat Shock Proteins: Functions And Response Against Heat Stress In Plants. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 3(11), 204–218. Recuperado el 14 de Abril de 2016 de <http://www.ijstr.org/final-print/nov2014/Heat-Shock-Proteins-Functions-And-Response-Against-Heat-Stress-In-Plants.pdf>
- Van Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J., ..... Gheysen, G. (2004). Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (*Caricaceae*) using PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1473–1486. Recuperado el 22 de Agosto de 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s00122-003-1575-7>
- Vanacker, H., Sandalio, L., Jiménez, A., Palma, J., Corpas, F., Meseguer, V., ... del Río, L. (2006). Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1735–1745. Recuperado el 17 de Julio de 2016 de <http://jxb.oxfordjournals.org/content/57/8/1735.full>
- Vidal, L., Finot, V., Mora, K. y Venegas, F. (2009). Características físico-químicas del látex de papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). *Información Tecnológica*, 20(6), 93–103. Recuperado el 27 de Marzo de 2016 de <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642009000600012>
- Wahid, A., Farooq, M., Hussain, I., Rasheed, R. y Galani, S. (2012). Responses

- and Management of Heat Stress in Plants (Cap 6). En Ahmad, P. y Prasad, M. N. V. (Eds.), *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (135-157). Nueva York, Estados Unidos: Springer-Verlag. Recuperado el 18 de Marzo de 2016 de <http://www.springer.com/gp/book/9781461408147>
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. y Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199–223. Recuperado el 18 de Mayo de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/222149184\\_Heat\\_tolerance](https://www.researchgate.net/publication/222149184_Heat_tolerance)
- Wu, X., Wang, J., Na, J., Yu, Q., Moore, R., 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. Recuperado el 25 de Mayo de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2010.04284.x/>
- Wu, Y., Zhao, D., Han, C. y Tao, J. (2016). Biochemical and molecular responses of herbaceous peony to high temperature stress. *Canadian Journal of Plant Science*, 96(3), 474–484. Recuperado el 29 de Junio de 2016 de <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/cjps-2015-0255>
- Yan, L. y Forster, M. (2011). Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: A review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(17-18), 1308–1315. Recuperado el 29 de Marzo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002321000485>
- Yogiraj, V., Goyal, P., Chauhan, C., Goyal, A. y Vyas, B. (2014). *Carica papaya* Linn: an overview. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(5 Part A), 1–8. Recuperado el 14 de Abril de 2016 de <http://www.florajournal.com/vol2issue5/jan2015/2-4-12.1.pdf>
- Zhao, X., Huang, L., Zhang, X., Li, Z. y Peng, Y. (2014). Effects of heat acclimation on photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and gene expression in orchardgrass under heat stress. *Molecules*, 19(9), 13564–13576. Recuperado el 11 de Julio de 2016 de <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/13564>

## **8. ANEXOS**

## Anexo 1. Temperaturas seleccionadas para el ensayo de estrés térmico directo

Tratamiento térmico (°C)	# de vasos <sup>a</sup>	# de plántulas por vaso	Tiempo del ensayo (horas)
Temperatura ambiente ~25°C (control del experimento)	4	5	4
Temperatura intermedia 33.5°C	4	5	4
Temperatura alta 45°C	4	5	4

*Nota:* <sup>a</sup> Cada vaso se tomó como una unidad experimental; es decir, que por cada tratamiento de temperatura se tenía un total de 4 réplicas.

## Anexo 2. Temperaturas seleccionadas para el ensayo de estrés térmico gradual

Tratamiento térmico (°C)	# de vasos	# de plántulas por vaso	Tiempo del ensayo (horas)	Tiempo total (horas) <sup>c</sup>
Temperatura ambiente ~25°C	4 <sup>a</sup>	2	0	168 <sup>c</sup>
27.5°C	12	2	12	12
30°C	12	2	12	24
Temperatura intermedia 33.5°C	12 <sup>b</sup>	2	12	36 <sup>c</sup>
35°C	8	2	12	48
37.5°C	8	2	12	60
40°C	8	2	12	72
42.5°C	8	2	12	84
Temperatura alta 45°C	8 <sup>b</sup>	2	12	96 <sup>c</sup>
Recuperación 45 a ~25°C	4 <sup>b</sup>	2	72	168 <sup>c</sup>

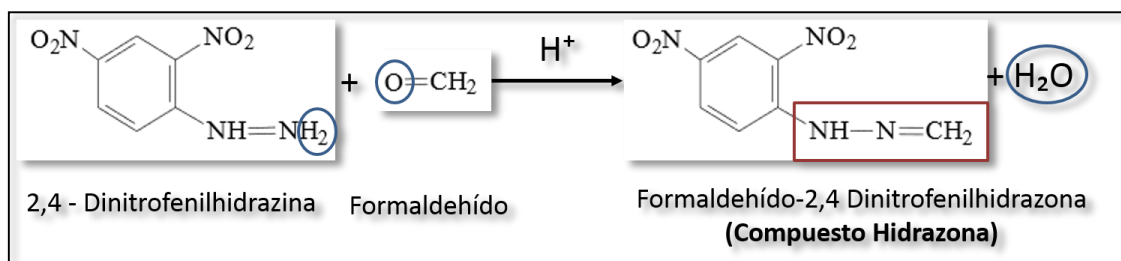
*Nota:* Las filas sombreadas indican las temperaturas seleccionadas en las que se extrajeron las muestras, dando un total de 4 tratamientos térmicos para este ensayo.

<sup>a</sup> Los 4 primeros vasos representan las muestras que se usó para el control del experimento; es decir, las plántulas que estuvieron a temperatura ambiente.

<sup>b</sup> Los 12 vasos se mantuvieron a una temperatura de 33.5°C, de los cuales se escogió 4 para extraer las muestras que representaban dicha temperatura; los 8 restantes continuaron con el ensayo hasta la temperatura de 45°C, donde de igual forma, se seleccionó 4 vasos para extraer las respectivas muestras que pertenecían a esta temperatura, quedando los últimos 4 vasos que correspondían a las muestras del tratamiento de recuperación (45 a ~25°C).

<sup>c</sup> La columna "Tiempo total" indica la hora acumulada en la que se extrajeron las respectivas muestras pertenecientes a las 4 temperaturas que se seleccionó.

Anexo 3. Formación del compuesto formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona mediante la reacción química entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y el formaldehído



Anexo 4. Ecuación obtenida de la curva de calibrado para el cálculo de concentración en [ $\eta$ moles.mL<sup>-1</sup>] de grupos carbonilos en función del formaldehído - 2,4 dinitrofenilhidrazona

$$\left[ \frac{\text{nmoles}}{\text{ml}} \right] \text{ de carbonilos} = \left[ \frac{(A_{\lambda 365} + 0.0027)}{0.0006} \right]$$

$A_{\lambda 365}$  = absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 365 nm