



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

MEDICIÓN DEL EFECTO QUE PROVOCA LA APLICACIÓN DEL
SULFATO DE AMONIO EN LA RESPUESTA DE VASCONCELLEA
PUBESCENS A TEMPERATURAS QUE PROVOQUEN ESTRÉS

AUTOR

FELIPE ALEJANDRO VILLACÍS VILLAGRÁN

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

MEDICIÓN DEL EFECTO QUE PROVOCA LA APLICACIÓN DE SULFATO DE AMONIO EN LA RESPUESTA DE *VASCONCELLEA PUBESCENS* A TEMPERATURAS QUE PROVOQUEN ESTRÉS

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

Profesor guía

PhD Fabio Marcelo Idrovo Espín

Autor

Felipe Alejandro Villacís Villagrán

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el (los) estudiante(s), 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 (Ciencias Biológicas: Biotecnología)

CC: 1705952255

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CC: 171809270-1

DECLARACIÓN 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.

Felipe Alejandro Villacís Villagrán

CC: 1721108361

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Oswaldi, Marthy y Emilillo, la mejor familia que un Ingeniero en Biotecnología puede tener. Gracias por apoyarme y darme su eterno cariño.

Gracias al profe Fabio, por darme la oportunidad (de salir de titular y obtener los 3 puntos) de haber cumplido este sueño, por sus enseñanzas y por su guía.

Gracias a Barby, por su tiempo, por su paciencia y por su incondicional apoyo.

Gracias a mis amigos (Timmy Vane, Chichi, Eileen, Edi ciedi, Rena, May) que me ayudaron en este exitoso camino.

Gracias por leer esto.

DEDICATORIA

Se lo dedico a Emilio José. Como el ejemplo de triunfo que le deseo, a él que es el mejor de todos.

Se lo dedico a mis padres que ven en este texto, otro éxito como los grandiosos padres que son.

Se lo dedico a Gabriela Salomé y al resto de mi familia que me quieren y me apoyan siempre.

Se lo dedico a los mejores maestros que tuve, que me enseñaron a ser un buen Ingeniero.

Se lo dedico a mis amigos 3V-CURB, para que ellos lo consigan y sigamos unidos hasta la eternidad como profesionales.

Se lo dedico a mis compañeros BIORULES, para que también lo logren, para que compartan la sagrada palabra del ADN y hagan un mundo mejor.

RESUMEN

En la actualidad, la elevada temperatura ambiental es una de las principales causas de las pérdidas en la producción agrícola. El estrés térmico afecta a la calidad y rendimiento de los cultivos. En vista de esta problemática mundial, se ha propuesto el uso de sulfato de amonio para promover termotolerancia en plantas de *Vasconcellea pubescens*. El objetivo general de este trabajo fue examinar la influencia del sulfato de amonio en la respuesta de plántulas de *V. pubescens* a diferentes temperaturas que les provoquen estrés. Para determinar dicho efecto, se analizó la pérdida de electrolitos, la concentración de clorofila foliar y la actividad catalasa en las plántulas, posterior a la exposición a altas temperaturas. Primeramente, se hicieron crecer plantas de *V. pubescens* durante 15 semanas. Se analizó el porcentaje de germinación y de supervivencia. En la semana 15 se seleccionaron aleatoriamente 24 plantas (por cada repetición biológica), divididas en 2 grupos de 12, donde el primer grupo recibió un tratamiento de agua y el otro recibió un tratamiento de sulfato de amonio [6 mM], ambos durante una semana. En la semana 16, por cada tratamiento se hicieron tres grupos de 4 plantas, las cuales fueron sometidas a 25 °C, 33,5 °C y 45 °C respectivamente, durante 4 horas. Posteriormente, se realizaron análisis bioquímicos para evaluar el estrés generado en las plantas y las diferencias de los tratamientos. En el caso del porcentaje de pérdida de electrolitos, se observó que a mayor tiempo transcurrido se perdieron más electrolitos. Además que el tratamiento con sulfato de amonio presentó una menor pérdida de electrolitos. Para la concentración de clorofila (*a* y *b*), no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos. En la actividad catalasa se evidenció que dicha actividad bajaba significativamente a mayor temperatura y con el tratamiento de agua, mientras que en el tratamiento con sulfato de amonio se observó actividad estable. Con datos estadísticamente válidos, se concluyó que el sulfato de amonio podría estar involucrado en la termotolerancia en plantas de *V. pubescens* y es necesario analizar otras concentraciones del mismo, así como evaluar diferentes tipos y tiempos de estrés.

ABSTRACT

At present, the high ambient temperature is one of the main causes of the losses in agricultural production. Thermal stress affects the quality and yield of crops. In the light of this global problem, the use of ammonium sulfate has been proposed to promote a thermotolerance in plants of *Vasconcellea pubescens*. The general objective of this work was to examine the influence of ammonium sulfate on the response of *V. pubescens* seedlings to different temperatures that cause them stress. To determine this effect, electrolyte leakage, foliar chlorophyll concentration and catalase activity in the seedlings, after exposure to high temperatures, were analyzed. First, *V. pubescens* plants were grown for 15 weeks. The percentage of germination and survival was analyzed. At week 15, 24 plants were randomly selected (for each biological replicate), divided into 2 groups of 12, where the first group received a water treatment and the other received an ammonium sulfate treatment [6 mM], both for one week. At week 16, for each treatment three groups of 4 plants were made, which were subjected to 25 ° C, 33.5 ° C and 45 ° C respectively, for 4 hours. Biochemical analyzes were performed to evaluate the stress generated in plants and differences in treatments. In the case of the percentage of electrolyte leakage, it was observed that a longer time elapsed, more electrolytes were lost. In addition, treatment with ammonium sulfate allowed for less loss of electrolytes. For the chlorophyll concentration (*a* and *b*), no significant differences were found between treatments. In the catalase activity, it was observed that this activity decreased significantly at a higher temperature and with water treatment, while in the treatment with ammonium sulfate was observed a stable activity. With statistically valid data, it was concluded that ammonium sulfate promotes thermotolerance in the plants of *V. pubescens* and it is necessary to analyze other concentrations of the same, as well as to evaluate different times of stress.

ÍNDICE

1. TÍTULO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Antecedentes.....	1
2.2 Planteamiento del problema	2
2.3 Justificación	3
2.4 Objetivo General	5
2.4.1 Objetivos específicos	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Efecto del aumento de la temperatura ambiental en el crecimiento de cultivos	6
3.1.1 Efecto del aumento de la temperatura ambiental en el la producción agrícola de Ecuador.....	6
3.1.2 Adaptabilidad de cultivos en zonas tropicales	8
3.1.3 Mecanismos de respuesta de las plantas al estrés abiótico.....	9
3.1.4 Estrés térmico	10
3.2 Efectos y fuentes de Nitrógeno usadas en el desarrollo de cultivos	12
3.2.1 Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno para las plantas	13
3.2.2 El Sulfato de amonio como potencial compuesto para aumentar la termotolerancia en plantas	14
3.3 Procesos bioquímicos para medir el daño celular provocado por estrés	16
3.3.1 Conductividad y porcentaje de electrolitos perdidos en hojas.....	16
3.3.2 Clorofilas <i>a</i> y <i>b</i>	17
3.3.3 Actividad de la catalasa en plantas	19
3.4 Generalidades del género <i>Vasconcellea</i>	20

3.4.1 Generalidades de <i>V. pubescens</i>	20
3.4.2 Características morfológicas de <i>V. pubescens</i>	21
3.4.3 Importancia de <i>V. pubescens</i> en el Ecuador	22
3.4.4 Usos y potenciales aplicaciones biotecnológicas de <i>V. pubescens</i>	23
4. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	24
4.1 Diagrama de flujo	26
5. PROCEDIMIENTOS	27
5.1 Determinación de la población y muestra	27
5.1.1 Desinfección de las semillas de <i>V. pubescens</i>	27
5.1.2 Siembra de las plantas de <i>V. pubescens</i>	27
5.1.3 Crecimiento de las plantas de <i>V. pubescens</i>	28
5.2 Procedimientos para la obtención de datos	28
5.2.1 Estandarización de los métodos de análisis bioquímicos	29
5.2.1.1 Método de la concentración de la clorofila.....	29
5.2.1.2 Método de pérdida de electrolitos	30
5.2.1.3 Método de la actividad enzimática de la catalasa.....	30
5.2.2 Aplicación del sulfato de amonio en las plantas de <i>V. pubescens</i>	31
5.2.3 Inducción de estrés por aumento de temperatura.....	32
5.2.4 Análisis de concentración de clorofila.....	33
5.2.5 Análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos	34
5.2.6 Análisis de la actividad enzimática de la catalasa.....	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
6.1 Porcentaje de germinación y crecimiento de plantas de <i>V. pubescens</i>	37
6.2 Estandarización de los métodos de análisis bioquímicos	40
6.2.1 Método de concentración de la clorofila	40
6.2.2 Método de pérdida de electrolitos	44

6.2.3 Método de actividad enzimática de la catalasa	46
6.3 Análisis de ensayos bioquímicos finales	49
6.3.1 Análisis de concentración de clorofila.....	49
6.3.2 Análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos	54
6.3.3 Análisis de la actividad enzimática de la catalasa.....	57
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
7.1 Conclusiones	62
7.2 Recomendaciones.....	63
8. REFERENCIAS	65
ANEXOS	74

1. TÍTULO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Medición del efecto que provoca la aplicación de sulfato de amonio en la respuesta de *Vasconcellea pubescens* a temperaturas que provoquen estrés.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

El aumento de la temperatura ambiental es uno de los principales obstáculos para lograr una producción agrícola más eficiente, ya que las altas temperaturas están provocando pérdidas globales. Una reducción en el crecimiento y un detrimento en la calidad de los cultivos son las principales consecuencias del estrés térmico ambiental (Tai et al., 2014, p.820). Las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia cuando se encuentran en estrés por altas temperaturas, los mismos que les permiten mantener la homeostasis celular. Los mecanismos que les brinda esta resistencia son producto de la expresión de genes específicos, así como de procesos bioquímicos que se activan cuando la planta sufre estrés térmico (Kumar y Wigge, 2010, p.135).

En países de Latinoamérica se han observado temperaturas extremas que están afectando a la agricultura y en nuestro país no es la excepción. Debido a la escasez de agua y las temperaturas extremas, durante el 2011 se provocaron el 47 % de las pérdidas totales en Ecuador (Ortiz, 2012). Por tanto, conocer los mecanismos de termotolerancia en plantas es de vital importancia para implementar metodologías que ayuden a reducir pérdidas en los cultivos agrícolas. El sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ha sido un compuesto muy usado en la agricultura como una excelente fuente de nitrógeno y azufre para la planta. En la actualidad se han desarrollado estudios que han usado el sulfato de amonio, no sólo como un fertilizante, sino como un factor que promueve una termotolerancia en las plantas (Bajji et al., 2001, p.2).

Debido a que el Ecuador se ubica en una zona tropical, las especies vegetales de nuestro país están mejor adaptadas a temperaturas altas, propias de esta región. Una especie de interés es *Vasconcellea pubescens* (chamburo), ya que es una planta silvestre y de características únicas en Ecuador. Esta especie es de apariencia similar a la papaya, posee un fruto comestible y rico en papaína. A diferencia de la papaya tropical (*Carica papaya*), el chamburo o papaya de alta montaña (*V. pubescens*) crece en climas más fríos (Vega y Lemus, 2006, p.23).

2.2 Planteamiento del problema

El clima actualmente tiende a cambiar constantemente, por lo que ocasiona problemas en la economía mundial, siendo el sector agrícola uno de los de mayor vulnerabilidad. La agricultura se desarrolla en un lugar específico porque se ha adaptado a condiciones climáticas relativas. Sin embargo, cambios extremos de temperatura afectan a la producción sistemática. El problema del aumento de temperatura es cada vez más evidente e insostenible, especialmente en las zonas tropicales. La búsqueda de soluciones ya ha empezado, sobre todo con sistemas alternativos de producción. Una de las soluciones que está en pleno desarrollo es la de los mecanismos de resistencia en las plantas frente al aumento de la temperatura ambiental (Lau, Jarvis y Ramírez, 2011, p.4).

Muchos de estos mecanismos aún no han sido estudiados a profundidad, como por ejemplo el de la expresión de genes especializados en resistencia al estrés térmico. *Arabidopsis thaliana* ha servido como modelo para la comprensión de la acción de las histonas en el termosensado (Kumar y Wiggel, 2010, p.136). Así mismo, existen procesos bioquímicos que permiten a la planta obtener un cierto grado de tolerancia al calor. Estos procesos se pueden evaluar para tener un criterio del daño que produce las altas temperaturas. El estrés que provoca las elevadas temperaturas puede ser evaluado a través del daño provocado en los fotosistemas y los electrolitos liberados (Bajji et al., 2001, p.

3). Asimismo, la actividad de enzimas como la catalasa (que es una de las enzimas encargadas de proteger a las células cuando se encuentra bajo condiciones de estrés) tiene una actividad antioxidante que permite controlar los niveles de ROS (de sus siglas en inglés Reactive oxygen species). La actividad de la catalasa varía por cambios de salinidad y de temperatura, y por lo tanto sirve como un criterio válido para verificar el daño causado por el estrés térmico. Todos estos procesos mencionados son de mucha importancia cuando se pretende medir el efecto de un tratamiento novedoso en las plantas. El sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ aún no ha sido analizado como un potenciador de la termotolerancia, por lo que se podría medir correctamente su efecto, en plantas sometidas a dicho estrés (Wang et al., 2014, p.3).

Partiendo de este conocimiento, es de mucho interés evaluar el mecanismo de termo tolerancia, sobre todo en aquellas plantas de climas tropicales, ya que éstas se han ido adaptando al estrés térmico y han logrado crecer en estas condiciones. En Ecuador existe una enorme diversidad de plantas, cuyos genomas aún no han sido secuenciados y que, por lo tanto, esconden características fisiológicas de interés biotecnológico poco analizadas. En la actualidad, no existe información sobre tratamientos que mejoren la termotolerancia en variedades tropicales de nuestro país. La *V. pubescens* es una especie silvestre que no ha sido evaluada a nivel bioquímico (Tapia et al., 2008).

2.3 Justificación

Los efectos negativos de las elevadas temperaturas sobre la agricultura son una buena razón para evaluar el grado de termotolerancia que las plantas poseen. Adicionalmente si se logra potenciar esta tolerancia, se podría extrapolar este conocimiento en todas las especies vegetales. Como se ha visto, la tasa de crecimiento de una especie vegetal se ve mermada cuando la

temperatura supera el óptimo y se detiene cuando la temperatura es máxima (Hatfield et al., 2011, p.358).

Estudios previos han comprobado que el uso de compuestos químicos que actúan como fuente de N, aumentan eficientemente la tolerancia de las plantas frente al estrés por aumento de temperatura. En la investigación de Wang et al. (2014), se probó que el maíz y la cebada aumentaban su termotolerancia cuando previamente recibían un pre tratamiento con Nitrógeno (sales de amonio). En otro estudio se demostró que el tomate (*Solanum lycopersicum*) recepta eficientemente las sales de amonio (NH_4^+) como fuente de N, lo que a la larga, aumentaba la termotolerancia de estas plantas cuando fueron sometidas a estrés por temperatura elevada. El análisis de la termotolerancia podría ser un mecanismo que puede ser potenciado con la fuente de nitrógeno correcta y que puede ser evaluado en varias especies de plantas, para generar datos de aclimatación y sobre todo, un análisis proteómico posterior en respuesta a condiciones de estrés (Rivero et al., 2004, p. 703). Para medir el cambio que provocan las fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio en la termotolerancia, se puede evaluar la pérdida de electrolitos que se producen debido a dicho estrés en las plantas, ya que es un criterio para establecer el nivel de daño de las plantas (Bajji et al., 2001, p.4). Por otra parte, se conoce que la fotosíntesis es muy sensible al estrés causado por temperaturas extremas. La fotosíntesis es un proceso que se inhibe mucho antes que otras funciones celulares y por lo tanto, la concentración de la clorofila puede utilizarse como una forma para evaluar el daño de los fotosistemas (Chen y Cheng, 2009, p. 113) y así sería usada directamente como marcador para evaluar el nivel de daño por estrés.

Las estrategias biotecnológicas permiten realizar análisis en cualquier planta, en este caso, se pretende evaluar la *V. pubescens*. Esta planta se propone como objeto de estudio, ya que se considera una variedad silvestre, la cual posee características fisiológicas, capaces de brindar nueva información sobre el mecanismo de termotolerancia de las plantas tropicales. Se menciona al

chamburo como una planta tropical ya que nuestro país se encuentra en la zona intertropical, lo que determina que las plantas de esta zona solo tienen las estaciones de verano e invierno. Sin embargo, por la altitud en la que crece, el chamburo es también considerado una especie de los Andes, y ya que se desarrolla en un hábitat interesante, es de gran interés biotecnológico analizar sus características fisiológicas en pos de obtener nueva información valiosa sobre su capacidad de termotolerancia (Hernández, 2011). *V. pubescens* al no ser una especie totalmente domesticada, posee un material genético más homogéneo. En el Ecuador *V. pubescens* es un cultivo subutilizado y no ha existido una promoción adecuada en el mercado. La falta de información y la gran variedad de especies de *Vasconcellea* que tiene nuestro país, son razones para que se explote el potencial que poseen estas plantas y así fortalecer el conocimiento de especies endémicas (Hruz et al., 2008, p.4). Al comprender las características de adaptabilidad a distintas condiciones de estrés, en un futuro se podrá mejorar los rendimientos y calidad de cultivos de interés comercial. Esta propuesta de experimentación en ciencia básica se justifica por los beneficios teóricos que aportará sobre la termotolerancia que puede incrementarse en una especie vegetal de interés comercial. Puede ser la base de impacto para nuevas investigaciones en el futuro sobre este tópico.

2.4 Objetivo General

Examinar la influencia del sulfato de amonio en la respuesta de plántulas de *V. pubescens* a temperaturas elevadas.

2.4.1 Objetivos específicos

a) Determinar el efecto de la aplicación de sulfato de amonio en la pérdida de electrolitos y la concentración de clorofila foliar en plántulas de *V. pubescens* posterior a la exposición a altas temperaturas.

b) Determinar la actividad de la enzima catalasa en plántulas de *V. pubescens* posterior a la exposición a altas temperaturas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Efecto del aumento de la temperatura ambiental en el crecimiento de cultivos

El calentamiento global durante la última década se ha convertido en una fuente de estrés para la gran mayoría de cultivos alrededor del mundo. El aumento de la temperatura provoca el calentamiento global. Las zonas tropicales serán las más afectadas, ya que en estas zonas las precipitaciones son más vulnerables a decaer debido al cambio climático. Los pronósticos señalan que en el año 2030, la temperatura global aumentará 1 °C y para el 2100 se elevará entre 1,4 °C y 5,8 °C (Martins, 2014). Se estima que este aumento de temperatura será mayor en aquellas latitudes templadas y, a pesar de que esto podría incluso favorecer a la agricultura en aquellos suelos adecuados, la adaptación al estrés térmico será vital para las plantas. Por otro lado, la evapotranspiración disminuirá la humedad del suelo, convertirá progresivamente las zonas tropicales en áridas y ocasionará pérdidas de cultivos. En las zonas tropicales ubicadas en Asia meridional y el norte de Sudamérica, las precipitaciones van a disminuir, por lo que nuestro país será afectado severamente. Como es conocido, la temperatura ambiental y las lluvias son factores climáticos fundamentales para los cultivos, y si estos se ven afectados, la producción agrícola disminuye (Nicholls y Altieri, 2009, p. 2)

3.1.1 Efecto del aumento de la temperatura ambiental en el la producción agrícola de Ecuador

Según datos presentados en el 2010 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), Ecuador tiene 7,3 millones de hectáreas en donde se practica la agricultura. Las provincias con más actividad agraria son Manabí, Guayas, Loja, Esmeraldas y Los Ríos. La Costa ecuatoriana es más apta para especies vegetales de ciclos cortos. En la costa se cultiva bastante el banano, las frutas tropicales, el cacao, el

café entre otros mientras que en la Sierra se cultivan hortalizas, papas, maíz, etc. La Amazonía ecuatoriana es más un área forestal. Ecuador es un país agrario por excelencia, liderando incluso las exportaciones de banano y flores (Ramírez, 2013, p.12).

Nuestro país, se encuentra en la región tropical y por lo tanto, está siendo afectado por las elevadas temperaturas del ambiente. En los últimos 50 años se han registrado temporadas muy calurosas (ver figura 1), debido al progresivo aumento de la temperatura. Este fenómeno se debe a una mayor incidencia de radiación emitida por el sol. Este clima perjudica especialmente a las especies vegetales de ciclos largos (Ministerio del Ambiente, 2013). El excesivo calor está provocando que los cultivos se marchiten, como en el caso del cacao y el banano en Manabí. Las altas temperaturas afectan más a los cultivos de la Sierra ecuatoriana y las bajas temperaturas a los cultivos de la Costa. Existen temporadas en las cuales hay meses sin lluvias. En el 2012, varias hectáreas de papas, tomate, fréjoles y cebolla fueron arruinadas por la falta de lluvia en la provincia del Carchi. Según el MAGAP (2011), los agricultores que no tienen agua de riego son los más afectados. El clima es tan cambiante hoy en día que, al no existir una regularidad, los pequeños y medianos agricultores pierden varias hectáreas de cultivos. Este problema a la larga ocasiona que los precios de los vegetales suban, para compensar las amplias pérdidas de cultivos (Díaz, 2012. p. 16).

Debido a las pérdidas agrícolas mencionadas en nuestro país, cabe entonces analizar cómo las plantas se adaptan en general al estrés abiótico en zonas tropicales, y así brindar soluciones eficientes.

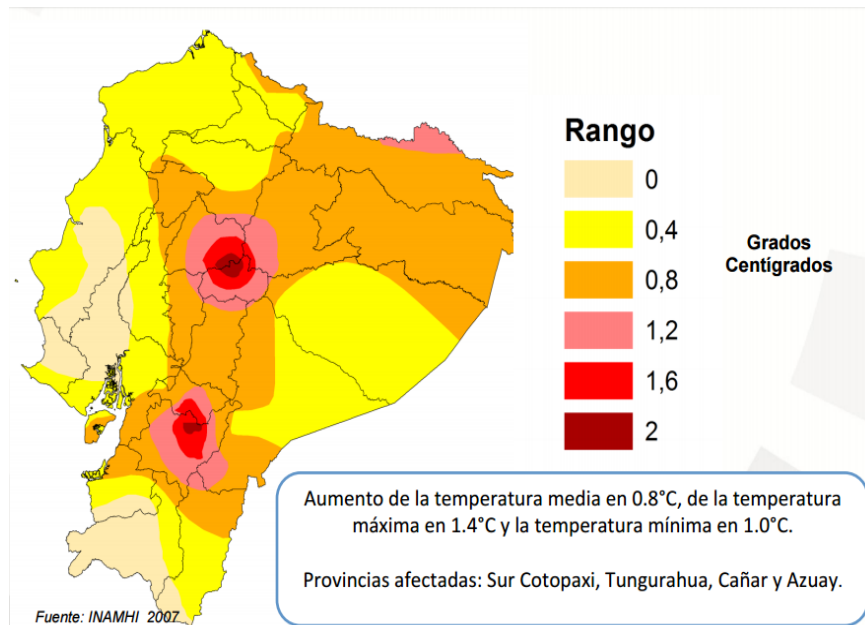


Figura 1. Aumento de temperatura media y provincias afectadas del Ecuador entre 1960 a 2006 Tomado de INAMI, 2007.

3.1.2 Adaptabilidad de cultivos en zonas tropicales

Las zonas tropicales son aquellas que se encuentran ubicadas dentro de los trópicos de Cáncer y Capricornio. En estas zonas no existen las cuatro estaciones, por lo que su clima dependerá de la altitud sobre el nivel del mar. Si es que existen lluvias permanentes, es posible sembrar por todo el año, en dependencia de la sensibilidad de los cultivos. El poder sembrar durante todo el año representa una ventaja de producción agrícola, ya que se puede proveer y exportar alimentos que no tienen las zonas templadas. La desventaja de las zonas tropicales es que las plantas deben combatir plagas muy agresivas durante todo el año; Las lluvias son más intensas, lo que genera erosión de los suelos así como enfermedades bacterianas y fúngicas (Hernández, 2011).

Por lo mencionado, los agricultores que trabajan en zonas tropicales sufrirán bajas en la producción de los cultivos de primera necesidad. El problema de estos cultivos es que al ser domesticados completamente, son muy propensos a sufrir el deterioro en su productividad. Los

agricultores se preparan para soportar el cambio de temperatura ambiental de una forma eficiente. La mejor manera de adaptarse es usar variedades locales de plantas, las cuales puedan soportar las sequías. Se han desarrollado sistemas agrícolas que se adaptan al estrés térmico y permiten una producción eficiente. Un sistema muy usado es la producción y monitoreo de cultivos nutridos con eficientes sistemas de riego y un sustrato adecuado. El estrés abiótico es un indicador de que la agricultura necesita diversificarse, y de esa manera ser menos vulnerable al deterioro. Estrategias como los policultivos, uso de genética local, y coberturas forestales son soluciones potenciales para evitar daños en los cultivos (Jordán, 2001, p.2). En este caso, es importante el enfoque en el potencial genético que tienen ciertas especies y que, debido a sus características, se puede obtener información valiosa de como las plantas afrontan la adaptación al estrés abiótico.

3.1.3 Mecanismos de respuesta de las plantas al estrés abiótico

Durante millones de años, los constantes cambios climáticos del planeta han provocado que las plantas desarrollen mecanismos de adaptación que aseguren su supervivencia. Las especies de plantas que existen en la actualidad poseen mecanismos morfo y fisiológicos que les permiten desarrollarse de una forma armónica en el hábitat en el que se encuentran. Las plantas se han adaptado para ser tolerantes a factores abióticos que provocan estrés, como la sequía, salinidad, altas concentraciones de metales pesados, gases de invernadero, inundaciones y a la radiación principalmente (Jordán, 2001, p.3). A continuación se hará énfasis en la adaptabilidad al estrés térmico.

3.1.4 Estrés térmico

La temperatura es el principal factor abiótico que limita el crecimiento vegetal. El estrés térmico se puede dar por las bajas y altas temperaturas. En este caso se hará mención de las altas. Las ROS se acumulan debido a diferentes tipos de estrés abiótico, y por lo tanto con la exposición a elevadas temperaturas ambientales. Las ROS provocan daños celulares que afectan al metabolismo vegetal. En la actualidad, durante el día, las plantas están expuestas a altas temperaturas que limitan el mantenimiento de las proteínas estructurales del tallo y las hojas. Enzimas que están involucradas en el crecimiento también se han visto afectadas. Si se registrasen temperaturas lo suficientemente altas (mayores a 55 °C), los procesos bioquímicos de la planta no se realizarían correctamente, llevándola a la muerte. Las altas temperaturas provocan cambios morfológicos en las plantas como quemadura de hojas, inhibición del crecimiento radicular, frutos en mal estado. Todo esto es debido a que las ROS dañan el ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos (Waraich et al., 2012, p. 222-224).

A continuación se describen algunos mecanismos de adaptación de las plantas al estrés térmico:

- **Tasa transpiratoria:** las altas temperaturas aumentan la tasa de transpiración, por lo que se promueve la pérdida de agua en forma de vapor por la apertura de los estomas. Esta pérdida de agua como vapor produce enfriamiento (Waraich et al., 2012, p. 223).
- **Apoyo osmótico:** las hojas que tienen más exposición a la luz y por ende a la temperatura, son capaces de producir ciertos compuestos (osmolitos tales como sacarosa, glicerol, aminoácidos

libres, etc) para retener el agua, evitando la deshidratación (Waraich et al., 2012, p. 224).

- **Aceleración de la senescencia:** a través de fitorreguladores, esta estrategia se presenta más en plantas con hojas anchas pero no carnosas. El ácido abscísico (ABA) es el que permite que los estomas se cierren cuando existen periodos de escasas de agua. Las altas temperaturas al generar un déficit hídrico, provocan el cierre de estomas. Dicho cierre afecta a la tasa fotosintética. Este complejo mecanismo de cierre de estomas evita pérdidas excesivas de agua. Por otra parte, las giberelinas pueden retrasar la senescencia, por lo que su producción se ve mermada para que se promueva la senescencia (Waraich et al., 2012, p. 224).
- **Protección del ADN por la acción de histonas H2A.Z:** de esta manera el material genético está protegido de las altas temperaturas, y a la vez se protege inherentemente la síntesis de proteínas y el resto de metabolitos primarios. Las proteínas denominadas histonas, son las encargadas de compactar y proteger al ADN, y por lo tanto, pueden tener una acción fundamental en la tolerancia al estrés térmico (Acosta y Zavala, 1996, p. 167).

Se podría mencionar otros mecanismos específicos para tolerar el estrés térmico de ciertas especies vegetales. Sin embargo, es importante enfocarse en una forma mediante la cual se pueda potenciar de forma general la termotolerancia en todas las plantas. Un comportamiento general permitiría entender el comportamiento de la gran mayoría de plantas.

Ecuador es un país esencialmente agrícola, y está obligado a fortalecer y mejorar la calidad de sus cultivos. Debe existir una transformación de

un sistema agrícola empírico a uno que aplica el conocimiento de las nuevas investigaciones. Nuestro país tiene una variedad de plantas que son candidatos al análisis del termosensado vegetal. Un buen ejemplo son las plantas del género *Vasconcellea*, ya que son plantas que habitan la zona tropical y al mismo tiempo, ciertas especies son de climas templados, debido a su ubicación en la zona andina.

3.2 Efectos y fuentes de Nitrógeno usadas en el desarrollo de cultivos

El Nitrógeno (N) es un elemento esencial para las plantas, es el componente principal de la clorofila (figura 2) y por tanto se involucra en la fotosíntesis. El Nitrógeno forma parte de los aminoácidos, enzimas, proteínas y fitorreguladores. Es considerado como un macronutriente esencial, por lo que las plantas requieren altas cantidades del mismo para múltiples funciones, sobre todo para permitir la absorción del resto de minerales, y puede ser absorbido en sus formas orgánicas e inorgánicas. A medida que un cultivo se desarrolla más, el contenido de nitrógeno que requiere también aumenta de forma proporcional. Adicionalmente, se conoce que, a mayor disponibilidad de nitrógeno, la planta sintetiza más moléculas de clorofila. De forma general, el contenido de N reflejado en el peso seco de las plantas varía entre el 1 al 5% (Perdomo y Barbazán, 2008, p.1).

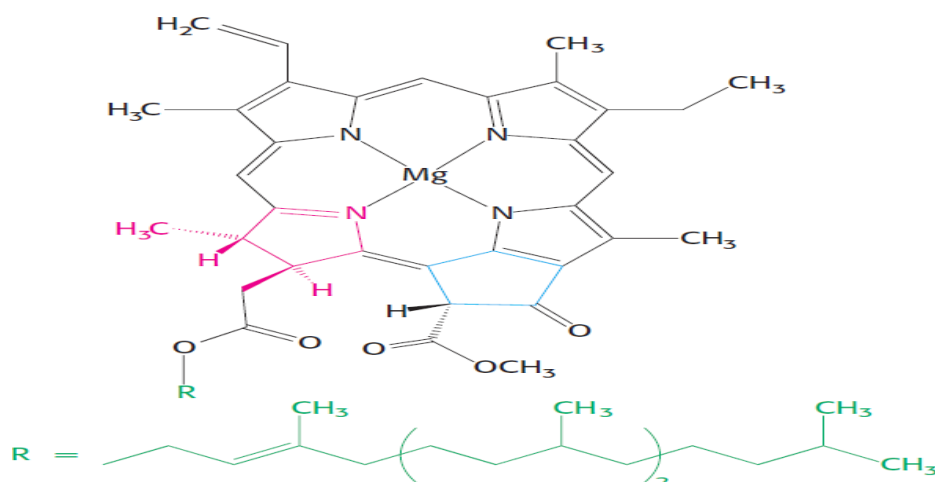


Figura 2. Molécula de clorofila, constituida por 4 átomos de nitrógeno. Tomado de Berg et al, 2011.

El Nitrógeno, dependiendo de la especie vegetal, es absorbido como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+). Las bacterias nitrificantes tienen un papel importante en los cultivos, ya que absorben la mayor parte de su N como NO_3^- . Los nitratos son muy solubles y se pierden por los lavados y por desnitrificación. Por otro lado, el amonio tiene poca movilidad en el suelo, por lo que puede ser mejor retenido aunque se pierde a través de la volatilización. La absorción de NH_4^+ se produce mayoritariamente en las etapas tempranas del desarrollo. En un pH 8 se presenta la tasa de absorción máxima de NH_4^+ (Perdomo y Barbazán, 2008, p.53).

Debido a la importancia del N, se han desarrollado fertilizantes para que actúen como fuentes esenciales de Nitrógeno, y así los cultivos puedan desarrollarse eficientemente. Los fertilizantes nitrogenados se clasifican en orgánicos e inorgánicos, entre ellos el sulfato de amonio (Calviño, Echeverría y Redollati, 2002, p.37).

3.2.1 Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno para las plantas

Los fertilizantes a base de sulfato de amonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] son muy usados alrededor de todo el mundo. Su uso extendido se debe a que es compatible con otros fertilizantes (lo que permite mezclarlos) y también debido a que aporta azufre y nitrógeno en adecuadas concentraciones. El nitrógeno del fertilizante aporta en el crecimiento vegetal, ya que ayuda en el proceso de la fotosíntesis. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ayuda al desarrollo de todo tipo de especies vegetales, ya que aporta al calentamiento de la planta en épocas frías y también promueve la nutrición de los microorganismos. Se recomienda que su aplicación sea directamente en el suelo, sobre todo en cultivos que demandan mucho azufre. El éxito de este fertilizante se debe a que la mayoría de los suelos tienen una escasez de N, y por lo tanto, representa una buena fuente del mismo. La concentración de sulfato de amonio como fertilizante varía (Lara, Korndorfer y Motta, 1997, p.482). El rango usual se ubica entre los 160.5

hasta 1176.2 kg por hectárea (Lingenfelter, 2015, p.30). El modo de aplicación depende del tipo de cultivo, ya que puede ser en el inicio de la siembra o de forma progresiva. Hay que recalcar que debido a la dosis nitrificadora (21% de N) que brinda el sulfato de amonio, se considera un tratamiento costoso pero efectivo. Actualmente, es ampliamente usado en el cultivo de cereales, arbustos y tubérculos. Se usa el sulfato de amonio comercial tanto en campos abiertos y en invernaderos. Se ha comprobado que este fertilizante brinda a las plantas protección contra los hongos, debido al azufre que contiene. Su uso se da especialmente en suelos alcalinos debido a su efecto acidificante (Peña et al., 2004, p. 626).

Aunque la función del sulfato de amonio como fertilizante es ampliamente conocida, se desconoce el efecto del mismo en otros procesos vegetales. Si se conoce que el N que aporta el fertilizante fomenta la fotosíntesis, se puede plantear que puede estar involucrado en funciones asociadas directamente. Ya que el estrés abiótico producido por las elevadas temperaturas afectan a los fotosistemas, el sulfato de amonio podría contribuir a la termotolerancia.

3.2.2 El Sulfato de amonio como potencial compuesto para aumentar la termotolerancia en plantas

El estrés térmico es capaz de dañar los fotosistemas que realizan la fotosíntesis, por lo que reforzar las fuentes de nitrógeno puede fomentar la presencia de más clorofila, y eventualmente minimizar el daño causado por las altas temperaturas. El estrés térmico provoca que las plantas sintetizen proteínas de choque térmico (HSP) como un mecanismo de defensa. Se ha observado que, tratamientos con fuentes de nitrógeno, han promovido una mayor termotolerancia en el desarrollo del césped (*Agrostis stolonifera L*), ya que mejoró su calidad visual, eficiencia fotoquímica y redujo la pérdida de electrolitos. Todo esto

indica que la fuente de nitrógeno aportó a los efectos favorables para la planta (Wang et al., 2014, p.2).

El sulfato de amonio podría ser la fuente correcta de N, debido a que su dosis nitrificadora podría contribuir a la planta en varios procesos fisiológicos. Como se mencionó, el N es un mineral necesario en las plantas y se ha demostrado que en el *A. stolonifera* (césped), existió una correlación entre una fuente correcta de nitrógeno con una mayor termoestabilidad en ensayos de estrés por calor. Generalmente, los nitratos son más probados que el amonio como fuente de nitrógeno, por lo que el sulfato de amonio es un candidato con potencial para evaluar su aporte en la tolerancia a las elevadas temperaturas (Wang et al., 2014, p.2). En una reciente investigación, se informó que el maíz obtuvo una mayor eficiencia fotosintética bajo estrés térmico, cuando previamente fue tratado con dosis más altas de nitrógeno (Wang et al., 2008, p.3).

El sulfato de amonio tiene el potencial para ser evaluado, ya que podría tener una función mixta, tanto en el desarrollo vegetal como en su aporte a la resistencia a las altas temperaturas ambientales. Es verdad que existen otros mecanismos que son esenciales en la resistencia al calor extremo (como las mencionadas proteínas HSP), sin embargo, por la facilidad de uso, y por sus potenciales funciones adicionales, se busca una respuesta fisiológica mejor con el tratamiento de sulfato de amonio. Cabe resaltar que el sulfato de amonio, para que contribuya a la termotolerancia, no debe aplicarse en concentración de fertilizante sino en una mínima concentración.

3.3 Procesos bioquímicos para medir el daño celular provocado por estrés

La agricultura mundial sufre las consecuencias negativas del estrés térmico. El exceso de calor provoca cambios en las respuestas fisiológicas de las plantas, ya que afecta al metabolismo y al crecimiento. Desde la producción de proteínas de choque térmico, hasta cambios en la actividad enzimática, a continuación se describen ciertos procesos importantes que permiten medir el daño causado por el exceso de calor y que son criterios válidos para determinar la eficiencia de un tratamiento que pretenda mejorar la resistencia al calor.

3.3.1 Conductividad y porcentaje de electrolitos perdidos en hojas

El porcentaje de pérdida de electrolitos en una solución se puede medir con la conductividad generada en el medio. La conductividad se define como la capacidad que posee una solución acuosa para transmitir una corriente eléctrica. La conductividad depende de la concentración, temperatura ambiental y movilidad de iones dentro de la solución acuosa. La conductividad del agua tiende a aumentar con la exposición al aire y también por la cantidad de electrolitos presentes en el medio acuoso. Otros factores que alteran la conductividad son la cantidad de sólidos disueltos y la concentración de sales. Compuestos inorgánicos (sulfatos, nitratos, fosfatos, etc) son buenos conductores y compuestos orgánicos (azúcares, fenoles, alcoholes, etc) son malos conductores de la electricidad, ya que dependen de que tan bien se disocian en el agua. Para medir la conductancia, se utiliza dos electrodos inertes que se mantienen fijos. La conductancia de la solución en la que se mide, es inversamente proporcional a la distancia entre los dos electrodos. Cada solución posee una conductividad propia. Para realizar la medición de la conductancia de varias soluciones, deben tener de preferencia la misma temperatura, ya que el flujo de electrones se ve afectado por la

temperatura de la solución. La conductividad se reporta en las unidades de micro ohmos por centímetro. En el sistema internacional el ohm equivale al siemens (S), por lo que se puede reportar la conductividad en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Si se analiza el agua destilada utilizada en laboratorio, esta posee una conductividad entre 0,5 a 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Universidad de Puerto Rico de Mayagüez, 2010).

Estudios realizados en plantas han demostrado que cuando la temperatura ambiental supera los 40 °C, se produce una pérdida de electrolitos, es decir un desequilibrio en las relaciones hídricas. A pesar de que existen mecanismos de tolerancia al estrés térmico, se puede cuantificar los electrolitos perdidos por la planta en el tejido foliar (colocándolo en agua). Esto sirve como un criterio para saber si es que dicha pérdida de electrolitos puede verse afectada de acuerdo a un tratamiento previo en las plantas para fomentar la termotolerancia (Restrepo et al., 2013, p. 254).

3.3.2 Clorofilas *a* y *b*

La clorofila es una molécula de alta complejidad, y se encuentra presente en las plantas y en los organismos que realizan la fotosíntesis. Las clorofilas son pigmentos de color verde. Existe la clorofila tipo *a*, la misma que está presente en todos los organismos que realizan fotosíntesis (cianobacterias, plantas, protistas, entre otros). También existe la clorofila tipo *b*, que se la define como pigmentos accesorios encargados de absorber el resto de energía que la clorofila tipo *a* no puede. Las clorofilas se encuentran ubicadas en los plastos de las células eucariotas. Debido a que están asociados a pigmentos y proteínas ancladas en la membrana, forman los fotosistemas. Un fotosistema tiene en promedio 200 moléculas de clorofila *a* más la clorofila *b*, que en conjunto constituyen una antena (formada por

complejos que colectan la luz). La clorofila *a* es la más importante ya que es la encargada de transformar la luz en energía química. Las clorofilas pueden absorber en el espectro visible, en la luz azul (400-500nm) y luz roja (600-700 nm), mientras que reflejan el color verde (Calvo, 2009). La función del fotosistema II se puede evaluar a través de la fluorescencia que emite la clorofila. La fluorescencia es un fenómeno que permite medir la sensibilidad del fotosistema cuando ha sufrido daño debido a fuentes de estrés. Esta fluorescencia emitida por la clorofila permite dar un seguimiento al proceso de la fotosíntesis, y es muy empleada en la evaluación de la respuesta fisiológica vegetal. Las moléculas de la clorofila absorben la luz, misma que es destinada a varios procesos como la fotosíntesis y la que al perderse como calor, provoca fluorescencia. La fluorescencia emitida representa del 1 al 2% de la luz absorbida. De forma general, el proceso de la fotosíntesis es el que predomina. Sin embargo, cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés, el rendimiento de la fotosíntesis baja y por lo tanto la luz absorbida se dispersa. Para evaluar la fluorescencia de las clorofilas, se calculan coeficientes de la luz absorbida por las clorofilas presentes asociada al fotosistema II, y que es usada en procesos fotoquímicos. Dichos cálculos, arrojan valores de clorofila total, que son indicadores de que existe algún estrés y que sobre todo, permite detección temprana incluso antes de que existan evidencias visuales en las hojas (González et al., 2008, p. 119).

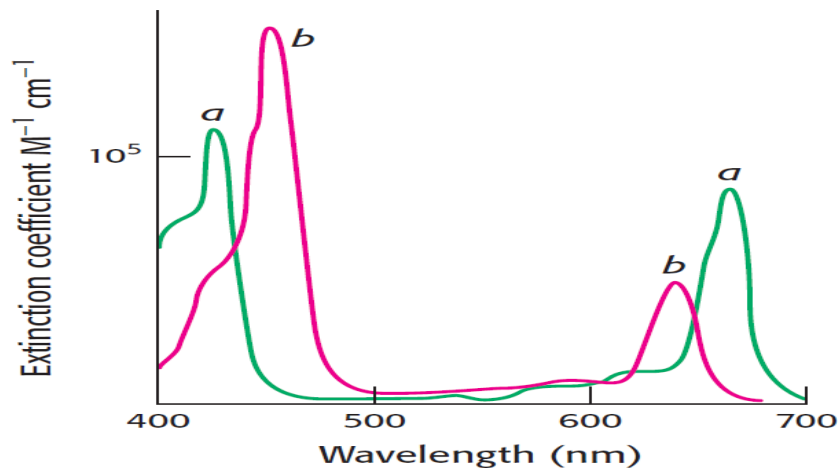


Figura 3. Longitud de onda a la que absorben luz la clorofila a (600-700 nm) y la clorofila b (400-500nm).

Tomado de Berg et al, 2011.

3.3.3 Actividad de la catalasa en plantas

Existen mecanismos de defensa en las plantas, que les permiten controlar los niveles de ROS en las células. Esta protección de las plantas frente a diferentes condiciones de estrés, se debe a la presencia de enzimas capaces de eliminar las ROS. Estas enzimas son la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Este mecanismo se conoce como defensa enzimática, ya que también existe la defensa no enzimática (mediada por carotenoides, ácido ascórbico, entre otros). La catalasa permite la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima es fotosensible y su actividad se ve afectada por la salinidad o el estrés térmico. Si existe una baja cantidad de H_2O_2 , la respuesta defensiva de la planta es eficiente. Sin embargo, un alto contenido de H_2O_2 conlleva a la muerte celular. A pesar de que una deficiencia de la catalasa no representa cambios fisiológicos en poca luz, un exceso de luz produce necrosis foliar (Universidad de Sevilla, 2007).

3.4 Generalidades del género *Vasconcellea*

Las plantas del género *Vasconcellea* pertenecen a la familia *Caricaceae*. Anteriormente se consideraba a *Vasconcellea* dentro del género *Carica* pero después de análisis genéticos y morfológicos se ha determinado las diferencias genéticas evidentes. *Vasconcellea* posee 21 especies dentro de las 35 existentes en la familia *Caricaceae*, por lo que es el género más amplio. La distribución de *Vasconcellea* se da mayoritariamente en la cordillera de los Andes con especial concentración en Ecuador. Dentro de nuestro país, existen 16 de las 21 especies de *Vasconcellea*, por lo que Ecuador representa una fuente de diversidad de este género (Vidal et al., 2009, p.93).

3.4.1 Generalidades de *V. pubescens*

La planta *V. pubescens* es una especie conocida comúnmente como chamburo, papayuelo o papaya de alta montaña. Su cultivo se ha extendido por Sudamérica ya que es nativa de este continente, y se la denomina papaya de alta montaña ya que crece en alturas que oscilan entre los 1500 a 2400 metros sobre el nivel del mar (Tapia et al., 2008). La *V. pubescens* (anteriormente denominada aquí como *Vasconcellea cundinamarcensis*), crece de forma natural en los Andes sudamericanos y también de forma controlada, sin embargo su cultivo no ha sido tan extendido y se la puede considerar como una especie no domesticada totalmente. Tiene un ritmo de crecimiento lento. Es capaz de producir hojas durante todo el año, especialmente en climas calurosos. Su tiempo de vida oscila entre los 5 a 7 años. Se ha reportado que esta planta puede soportar temperaturas ambientales de hasta -3°C . *V. pubescens* es considerada como arborescente y se han identificado que posee flores masculinas, femeninas e incluso hermafroditas, ya que al igual que la papaya, sus plantas son capaces de cambiar el sexo de las flores

durante el año, debido al aumento de temperatura ambiental (Caetano et al., 2008, p.241).

3.4.2 Características morfológicas de *V. pubescens*

Las plantas de *V. pubescens* cuando alcanza su madurez, se ven como un arbusto de hasta 6 metros de altura. Es una especie dicotiledónea y semileñosa. Posee hojas largas con una destacada apariencia tropical y con lóbulos. En el envés de las hojas se pueden observar pelos muy finos que lo recubren. Si el tallo sufre heridas, es capaz de exudar látex. Por otro lado, sus flores poseen cinco pétalos de textura carnosa y de un color amarillento. Las flores también son capaces de exudar látex (en su etapa inmadura) cuando han sufrido algún tipo de herida. *V. pubescens* puede generar frutos una vez al año si se encuentra en zonas frías, mientras que en regiones cálidas produce durante todo el año. El fruto es de color amarillento (al estar maduro) y comestible (sabor agridulce), los cuales tardan en madurar de 3 a 4 meses en el arbusto. Su tamaño es de aproximadamente 8 cm de largo por 5 cm de ancho, que se identifica por sus señales longitudinales que se originan en la base del ápice (ver figura 4). Sus semillas están envueltas en la pulpa del fruto. Se ha reportado que la germinación empieza alrededor de las 7 semanas. El fruto maduro se caracteriza por su aroma penetrante y similar al del babaco. Tiene una alta concentración de papaína (Vega y Lemus, 2006, p.23).



Figura 4. Morfología exterior e interior de un fruto maduro de *Vasconcellea pubescens*.

Tomado de Frutipedia, 2009.

3.4.3 Importancia de *V. pubescens* en el Ecuador

En nuestro país, el chamburo se propaga por semillas y generalmente se desarrollan en climas fríos y templados. En Ecuador, las provincias con mayor cultivo de *V. pubescens* son Azuay, Loja y Cañar. A pesar de que Ecuador posee 16 especies de *Vasconcellea*, la comercialización de esta planta no se da a gran escala comparado con otros frutos similares como la papaya (Proaño, 2007).

Esta planta constituye un recurso genético importante para nuestro país, ya que es una fuente de genes aún no analizados. Todo tipo de recurso genético aun no estudiado tiene un gran potencial para su explotación económica así como para generar datos científicos pioneros en su campo. Al ser esta especie endémica de nuestros Andes, tenemos la ventaja única y el deber de conocer sobre nuestra biodiversidad.

3.4.4 Usos y potenciales aplicaciones biotecnológicas de *V. pubescens*

El chamburo puede ser utilizado para su consumo en diferentes presentaciones, ya que su pulpa se puede comer fresca y también en diferentes postres, desde helados hasta rellenos de frutas. Su pulpa se puede cocer. Su consumo es recomendado, debido a que es rica en vitamina A, fosfato, magnesio y hierro, vitamina C. Otro uso importante es como ablandador de carne, ya que tiene papaína en altas concentraciones, Se ha reportado que la *V. pubescens* no sólo se cultiva por su fruto sino también por su uso ornamental debido al aroma exquisito que la caracteriza (Proaño, 2007).

Las potenciales aplicaciones biotecnológicas radican en que al ser una especie subutilizada, se puede obtener información nueva de respuestas fisiológicas. Se puede estandarizar su micropropagación, se puede fomentar su producción para aumentar su consumo, se puede analizar sus propiedades bioquímicas para encontrar principios activos y genes con potencial interés biotecnológico.

4. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

La realización de este proyecto experimental se basó en la manipulación *in vivo* de plantas de *V. pubescens* (cultivadas en laboratorio), que fue el principal material biológico. Para el análisis del material vegetal de estas plantas se utilizaron un potenciómetro (Fisher Scientific accumet XL600), un espectrofotómetro (Shimadzu UVI-VIS UVmini 1240) y un lector de placas (FLUOstar Omega). Por cada repetición biológica se utilizaron 24 plantas. A continuación en la tabla 1, se presentan los 6 tratamientos realizados.

Tabla 1.

Tratamientos a los que fueron sometidas las plantas de *Vasconcellea pubescens* en las dos réplicas biológicas.

Tratamiento	Condiciones del tratamiento y estrés a las 15 semanas de crecimiento
1	4 plantas tratadas con agua destilada durante 1 semana y luego mantenidas a 25 °C (control).
2	4 plantas tratadas con agua destilada durante 1 semana y luego sometidas a 33,5 °C por 4 horas.
3	4 plantas tratadas con agua destilada durante 1 semana y luego sometidas a 45 °C por 4 horas.
4	4 plantas tratadas con sulfato de amonio durante 1 semana y luego mantenidas a 25 °C (control).
5	4 plantas tratadas con sulfato de amonio durante 1 semana y luego sometidas a 33,5 °C por 4 horas.
6	4 plantas tratadas con sulfato de amonio durante 1 semana y luego sometidas a 45 °C por 4 horas.

Transcurrido el tiempo de estrés, se realizaron los análisis bioquímicos respectivos (porcentaje de pérdida de electrolitos, la concentración de clorofila foliar y la actividad de la enzima catalasa) con los materiales previamente descritos, a las 16 semanas de crecimiento (figura 1). Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA), usando la plataforma estadística Rcommander. Se realizó pruebas de Shapiro para comprobar la normalidad de los datos (en caso de no tener normalidad se realizó el ajuste necesario). El ANOVA fue la prueba estadística adecuada para verificar las diferencias significativas entre

tratamientos. La prueba de Duncan se empleó para analizar la relación de las variables dependientes (porcentaje de pérdida de electrolitos, la concentración de clorofila foliar y la actividad de la enzima catalasa) con las variables independientes (tratamiento con agua y sulfato de amonio y las temperaturas de estrés). Este ensayo se realizó por duplicado, con una semana de diferencia cada uno, para la validación estadística. Finalmente se recopilaron los datos de las dos réplicas biológicas para el análisis estadístico de los mismos, y así se obtuvieron las conclusiones.

4.1 Diagrama de flujo

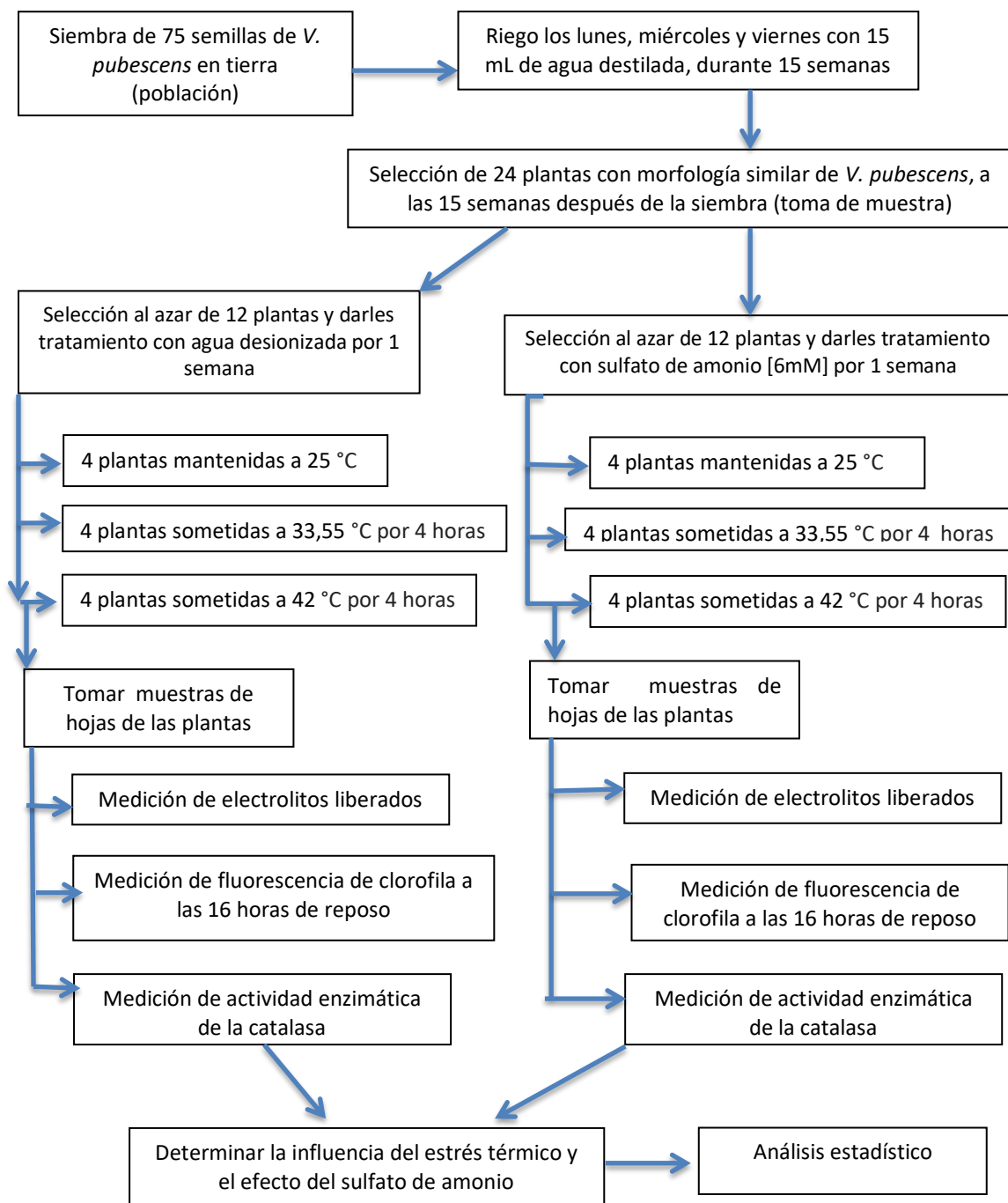


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso experimental realizado.

5. PROCEDIMIENTOS

5.1 Determinación de la población y muestra

Para la realización de este trabajo investigativo en ciencia básica, se utilizaron semillas de *V. pubescens*. Las semillas provenían de frutos de un árbol de chamburo ubicado en la provincia de Imbabura, de la ciudad de Ibarra, ubicada a una altura de 2220 metros sobre el nivel del mar. Posteriormente, a partir de estas semillas, se obtuvo la población y la muestra para los respectivos análisis bioquímicos.

5.1.1 Desinfección de las semillas de *V. pubescens*

Los frutos de chamburo se desinfectaron al lavarlos con agua y jabón primeramente. A continuación los frutos fueron sumergidos en una solución de 600 mL de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las semillas de *V. pubescens* fueron extraídas de los frutos limpios con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles dentro de una cabina de flujo. Las semillas recolectadas (aproximadamente 500) se desinfectaron introduciéndolas primeramente en un matraz de 500 mL, en el cual se añadió etanol al 96% por 3 minutos agitándolos. A continuación se extrajo el etanol y se añadió 50 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos en agitación manual. Para finalizar, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril de 6 minutos cada uno, para eliminar el cloro de las semillas. Las semillas fueron almacenadas en tubo falcón a una temperatura de -20 °C hasta su posterior uso.

5.1.2 Siembra de las plantas de *V. pubescens*

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en turba estéril (PRO-MIX PGX) que fue autoclavada. Se usaron vasos de cartón de 8 onzas, en

los cuales fueron colocados 120 g de turba por vaso. Con una pinza estéril se colocaron 3 semillas en cada vaso. Por cada repetición biológica se utilizaron 25 vasos con 3 semillas cada uno. Para cada una de las 2 réplicas biológicas se utilizaron el mismo número de vasos y semillas, con diferencia de una semana en la siembra para la segunda réplica.

5.1.3 Crecimiento de las plantas de *V. pubescens*

Las semillas de chamburo que fueron sembradas en turba fueron regadas los días lunes, miércoles y viernes con 15 mL de agua destilada. Los cambios semanales fueron anotados y se analizó dichos cambios durante 16 semanas.

En este caso, la población fue formada en el laboratorio, es decir, no fue recolectada de un medio externo. La población, por cada réplica biológica consistía en las 75 semillas sembradas de *V. pubescens*, que representan 75 plantas en potencial desarrollo.

De las 75 semillas sembradas, se trabajó con las plantas que germinaron. De aquellas plantas que sí germinaron, se tomaron 48 con morfología similar después de que hayan transcurrido 16 semanas, etapa en la cual se encuentran viables las plantas para los respectivos análisis. La muestra, en este caso consistió en las hojas verdaderas de las plantas, con las que se realizarán los análisis que se puedan extrapolar a la población.

5.2 Procedimientos para la obtención de datos

Los procedimientos realizados fueron realizados con equipos de alta precisión y reactivos adecuados, para el éxito de este trabajo experimental.

5.2.1 Estandarización de los métodos de análisis bioquímicos

Estos ensayos se realizaron con el fin de obtener datos de las concentraciones y diluciones correctas, a las cuales debía ser sometido el material vegetal. A continuación se detalla lo realizado en los tres análisis bioquímicos.

5.2.1.1 Método de la concentración de la clorofila

Se tomaron varias hojas de una planta de *V. pubescens* (a las 14 semanas) para someterlas a un shock térmico (se las introdujo en agua en ebullición) por 10 segundos. Luego, las hojas fueron colocadas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y sumergidas por 2 minutos en nitrógeno líquido. Después, a las hojas se les extrajo el exceso de agua y dentro de un mortero de aluminio se aplicó más nitrógeno líquido mientras se molía el material vegetal. Este material vegetal pulverizado se lo almacenó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a -20 °C.

A continuación, dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se colocaron 10 mg de polvo de las hojas de *V. pubescens* junto con 0,5 mL de etanol absoluto. Se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm y se extrajo el sobrenadante. Para comprobar a qué concentración la absorbancia era la correcta (es decir que no supere el valor de 1) se analizó la mejor disolución del sobrenadante con etanol, resultando ser la ideal una mezcla con una proporción de 4 volúmenes de etanol más 1 volumen del sobrenadante. De esta mezcla (con la proporción mencionada), se tomaron 200 µL y se colocaron en la placa para la respectiva lectura en el lector (FLUOstar Omega). Para realizar los ensayos de la fluorescencia de la clorofila, se evaluó a que cantidad de horas se liberaba una concentración de clorofila ideal (con comportamiento lineal). Por lo tanto, se realizó por duplicado (2 tubos de microcentrífuga) la mezcla de 10 mg de polvo de la hoja junto con 0,5 mL de etanol absoluto y se almacenó a las diferentes horas de prueba

(0, 2, 4, 8, 16, 24 y 48 horas). Transcurrido el tiempo respectivo, se midieron las absorbancias de la clorofila a 645 y 663 nm (absorbancias requeridas para el posterior cálculo de las concentraciones reales de clorofila).

5.2.1.2 Método de pérdida de electrolitos

Para este ensayo se usaron 2 plantas de *V. pubescens* (a las 14 semanas de crecimiento) y las cuales fueron sometidas a un estrés previo. Estas plantas sólo recibieron agua para su crecimiento. La primera planta fue sometida a 33,5 °C y la otra a 45°C, durante 4 horas, dentro de incubadoras (Thermo Scientific PRECISION). A continuación, usando un perforador de un solo hueco (6 mm), se obtuvieron 6 discos de las hojas de cada una de las plantas y se lavaron con agua destilada por 5 minutos. Después se extrajeron los discos de hojas y se las introdujo en un vaso de precipitación con 10 mL de agua destilada. Usando el potenciómetro (Fisher Scientific accumet XL600), se midió la conductividad que generaban los electrolitos liberados por los discos vegetales que provenían de las hojas sometidas a estrés de 33,5 °C y 45 °C. Las mediciones se realizaron a los 30, 45 y 60 minutos, para observar el comportamiento. Se midió también los electrolitos liberado del agua destilada sola. Este mismo procedimiento se realizó con 2 plantas pero que recibieron el tratamiento con sulfato de amonio por 1 semana.

5.2.1.3 Método de la actividad enzimática de la catalasa

Se tomó una hoja de una planta de *V. pubescens* (a las 14 semanas) y se la introdujo en un tubo de microcentrífuga. Se sumergió el tubo en nitrógeno líquido, y luego en un mortero de aluminio, se molió la hoja agregando más nitrógeno líquido. Se pesaron 200 mg del polvo de la hoja molida y se mezclaron con 100 µL de solución PBS, los cuales

fueron homogenizados con un pistilo y así se formó una pasta. Dicha pasta se centrifugó por 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Después se extrajo el sobrenadante. A la par, se preparó la solución de trabajo (fosfatos ácidos de sodio) y una disolución de H₂O₂ al 30%. Se trabajó con 3 diluciones del sobrenadante (75%, 50% y 25%), más la solución al 100%, todas ellas junto con la solución de trabajo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 240 nm, dentro de una cubeta de cuarzo. Las disoluciones se realizaron para observar el comportamiento de la actividad, relacionado con la concentración del sobrenadante. Se realizó la absorbancia a los 10, 30, 50 y 70 segundos, usando el espectrofotómetro (Shimadzu UVI-VIS UVmini 1240). De esta manera se buscó encontrar un comportamiento lineal y una dilución adecuada del sobrenadante, para posteriormente usar estas condiciones en las repeticiones biológicas.

5.2.2 Aplicación del sulfato de amonio en las plantas de *V. pubescens*

Antes de realizar los ensayos con el sulfato de amonio en las repeticiones biológicas, se realizó una evaluación previa de la concentración de sulfato de amonio adecuada. Siguiendo el protocolo de Rivero et al. (2004), se decidió aplicar una concentración 6 mM de sulfato de amonio (dicha concentración es inferior a la mínima requerida para actuar como fertilizante, por lo tanto, se evalúa su efecto como potenciador de la termotolerancia) en 10 plantas de *V. pubescens*. Se aplicó el sulfato cada dos días, una cantidad de 15 mL por planta, durante 8 días. Esta evaluación se realizó para visualizar si es que existía alguna respuesta fisiológica negativa, como algún tipo de clorosis en las hojas.

Se aplicó la solución de sulfato de amonio de acuerdo a lo mencionado, es decir, 15 mL de disolución cada dos días durante una semana. Se

seleccionaron 12 plantas de *V. pubescens* (que procedían de la primera réplica biológica) con morfología similar y se les aplicó dicho tratamiento. A la semana siguiente, se seleccionaron otras 12 plantas (segunda repetición biológica) de morfología similar, para aplicarles el mismo tratamiento de sulfato de amonio durante una semana. Para todas las plantas de cada réplica biológica, se realizó el tratamiento de sulfato de amonio en la semana 15 para que puedan ser analizadas en la semana 16.

5.2.3 Inducción de estrés por aumento de temperatura

Por cada repetición biológica, se usaron 24 plantas. Las 12 plantas de *V. pubescens* que recibieron el tratamiento con sulfato de amonio fueron agrupadas aleatoriamente en tres grupos de 4 plantas. Por otra parte, se seleccionaron 12 plantas con morfología similar, que recibieron el tratamiento solo con agua, y de la misma manera fueron agrupadas en tres grupos de 4 plantas. La inducción del estrés térmico se realizó de manera directa, es decir, un solo período en el cual se mantuvo una misma temperatura de estrés, dependiendo del tratamiento. Para llevar a cabo dicho estrés, los vasos con las plantas de *V. pubescens* fueron llevados a las incubadoras (Thermo Scientific PRECISION) a temperaturas de 33,5 °C y 45 °C por el lapso de 4 horas. Por otra parte, se usaron plantas a temperatura ambiente (25 °C) como control, para que posteriormente se pueda contrastar la temperatura ambiental como control. Transcurrido el tiempo de estrés, en todos los casos, se tomaron las hojas de las plantas para realizar los respectivos análisis bioquímicos con los protocolos estandarizados. 8 plantas fueron mantenidas a 25 °C (temperatura ambiente del laboratorio que sirve como control), 8 plantas a 33,5 °C y 8 plantas a 45 °C, en todos los casos 4 provenían del tratamiento con sulfato de amonio y las otras 4 plantas del tratamiento solo con agua.

5.2.4 Análisis de concentración de clorofila

Se utilizó la metodología mencionada en el apartado 5.2.1.1. Para los ensayos biológicos, las plantas de *V. pubescens* tenían 16 semanas de crecimiento. En este análisis fueron utilizadas todas las plantas de las 2 réplicas biológicas, tratadas con agua y tratadas con sulfato de amonio, sometidas a las diferentes temperaturas de estrés previamente descritas. Se utilizó el protocolo modificado de Hassan et al (2014). Luego de obtener el polvo del material vegetal, se pesaron 10 mg de polvo de la hoja y se mezclaron con 0,5 mL de etanol absoluto dentro de un tubo de microcentrífuga, y se almacenó por 16 horas (debido a que en los ensayos preliminares se obtuvo la mayor concentración de clorofila en este tiempo). Pasadas las 16 horas, se midieron las absorbancias de la clorofila a 645 nm y 663 nm dentro de la placa respectiva del lector (FLUOstar Omega). Por cada hoja se obtuvieron 2 tubos, de esa manera se realizaron dos repeticiones internas de cada hoja.

Las concentraciones de clorofila *a* y *b*, se calcularon con las ecuaciones de Arnon (1949) y después, en base a esos datos, se calcularon las concentraciones reales de clorofila *a* y *b*, usando las ecuaciones corregidas presentadas por Porra (2002), las cuales se presentan a continuación:

$$[Chl\ b] = 22,9(E^{645}) - 4,68(E^{663})$$

Ecuación 1: fórmula utilizada para calcular la concentración de clorofila *b* presentada por Arnon (1949). Donde E^{645} y E^{663} son las absorbancias obtenidas a esas respectivas longitudes

$$[Chl\ a] = 12,7(E^{663}) - 2,69(E^{645})$$

Ecuación 2: fórmula utilizada para calcular la concentración de clorofila *a* presentada por Arnon (1949). Donde E^{645} y E^{663} son las absorbancias obtenidas a esas respectivas longitudes de onda.

$$[Chl a + b] = 20,21(E^{645}) + 8,02(E^{663})$$

Ecuación 3: fórmula utilizada para calcular la concentración de clorofila $a + b$ presentada por Arnon (1949). Donde E^{645} y E^{663} son las absorbancias obtenidas a esas respectivas longitudes de onda.

$$Chl \frac{a^T}{b} = 0,593 + 0,459 \left(Chl \frac{a}{b} \right) + 0,229 \left(Chl \frac{a}{b} \right)^2$$

Ecuación 4: fórmula utilizada para calcular la relación de clorofila a sobre b presentada por Porra (2002). Donde $Chl \frac{a}{b}$ representada la relación obtenida entre los datos de las ecuaciones 2 sobre la 1.

$$[Chl a + b]^T = 0,895(Chl a + b)$$

Ecuación 5: fórmula utilizada para calcular la concentración real de clorofila $a + b$ presentada por Porra (2002).

$$[Chl a]^T = \frac{[Chl a + b]^T * Chl \frac{a^T}{b}}{\left(Chl \frac{a}{b} + 1 \right)}$$

Ecuación 6: fórmula utilizada para calcular la concentración real de clorofila a presentada por Porra (2002).

$$[Chl b]^T = \frac{[Chl a + b]^T}{\left(Chl \frac{a^T}{b} + 1 \right)}$$

Ecuación 7: fórmula utilizada para calcular la concentración real de clorofila b presentada por Porra (2002).

5.2.5 Análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos

Se utilizó la metodología mencionada en el apartado 5.2.1.2. Para los ensayos biológicos, las plantas de *V. pubescens* tenían 16 semanas de crecimiento. En este análisis fueron utilizadas todas las plantas de las 2 réplicas biológicas, tratadas con agua y tratadas con sulfato de amonio, sometidas a las diferentes temperaturas de estrés previamente

descritas. Este proceso se realizó en base a la metodología usada por Bajji et al. (2001), con modificaciones pertinentes. De igual manera, usando un perforador de un solo hueco (6 mm), se sacaron 6 discos de las hojas de cada una de las plantas y se lavaron con agua destilada por 5 minutos. Después se extrajeron los discos de hojas y se las introdujo en un vaso de precipitación con 10 mL de agua destilada. Usando el potenciómetro (Fisher Scientific accumet XL600), se midió la conductividad que generaban los electrolitos liberados por los discos vegetales que provenían de las plantas sometidas a estrés de 33,5 °C y 45 °C, y de las plantas controles de 25 °C. Las mediciones se realizaron a los 0, 30 y 60 minutos para analizar la pérdida de electrolitos con el paso del tiempo. Se midieron también los electrolitos liberados del agua destilada sola. Finalmente se midió la conductividad que se generó en el medio acuoso que contenían los discos vegetales, posterior a que hayan pasado por un proceso de autoclavado, ya que de esa manera se ocasionó la muerte celular, y así se obtuvieron los datos de conductividad con la pérdida del 100% de electrolitos, para contrastarlos con la conductividad generada en el estrés, y presentar el porcentaje de electrolitos perdidos en base a la relación descrita.

5.2.6 Análisis de la actividad enzimática de la catalasa

Se utilizó la metodología mencionada en el apartado 5.2.1.3. Para los ensayos biológicos, las plantas de *V. pubescens* tenían 16 semanas de crecimiento. En este análisis fueron utilizadas todas las plantas de las 2 réplicas biológicas, tratadas con agua y tratadas con sulfato de amonio, sometidas las diferentes temperaturas de estrés previamente descritas. Se realizó la metodología de Aebi, 1984 con modificaciones. Se utilizaron 100 mg del polvo de la hoja molida de *V. pubescens* mezcladas con 100 µL de solución PBS. Dicha pasta se centrifugó por 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Después se extrajo el sobrenadante. A la par, se preparó la solución de trabajo (fosfatos ácidos de sodio) y una

disolución de H₂O₂ al 30%. Para las absorbancias respectivas a 240 nm, se colocaron 10 µL de la dilución del sobrenadante junto con la solución de trabajo (50%-50%), más 990 µL de solución de trabajo y más 500 µL de la solución de H₂O₂ dentro de una cubeta de cuarzo. Finalmente se midió la absorbancia a los 10 y 70 segundos, usando el espectrofotómetro.

La actividad enzimática para todas las diluciones se calculó usando la siguiente fórmula:

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

Ecuación 8: fórmula utilizada para calcular la actividad enzimática de la catalasa, tomada de Aebi (1984). Donde t(10s) y t(70s) son las absorbancias correspondientes a la medición hecha a 240 nm de la dilución del sobrenadante vegetal.

5.3 Evaluación estadística de los datos

El análisis de los resultados obtenidos empezó por comprobar la normalidad de los datos, con la prueba de Shapiro. Dependiendo de los resultados de normalidad se procedió a hacer un ajuste de normalidad de datos y posteriormente se realizó el análisis ANOVA para encontrar diferencias significativas. Finalmente, se empleó una prueba de DUNCAN para comparación de medias.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Porcentaje de germinación y crecimiento de plantas de *V. pubescens*

Después de transcurridas 16 semanas (en cada repetición biológica), se utilizaron las plantas de *V. pubescens* que germinaron y se desarrollaron hasta ese momento. Entre las dos réplicas biológicas se obtuvo un promedio de 61,33 % de germinación, por lo que se trabajó con dichas plantas, las cuales fueron suficientes para obtener el material vegetal y realizar los análisis bioquímicos. El porcentaje de germinación de las semillas no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las dos réplicas biológicas (tabla 2).

Tabla 2.

Número de semillas sembradas y porcentaje de germinación de las plantas de *Vasconcellea pubescens* en las dos réplicas biológicas.

	Número de semillas sembradas	Número de plantas que germinaron	Porcentaje de germinación
Réplica biológica 1	75	49	65,33%
Réplica biológica 2	75	43	57,33%
Promedio	75	46	61,33%

De 150 semillas sembradas, germinaron 92 hasta la semana 10, donde se alcanzó el máximo umbral de cantidad de plantas. Sin embargo, en las semanas posteriores se perdieron 4 plantas, por lo que en la semana 16 se obtuvieron 88 plantas de *V. pubescens* listas para ser usadas en los ensayos. En la tabla 3 y en las figuras 6 y 7, se observan los cambios en el crecimiento de las plantas de *V. pubescens*. De las 92 plantas que crecieron, se obtuvo un 95,65% de germinación acumulada.

Tabla 3.

Número de plantas de *V. pubescens* obtenidas de acuerdo al número de semanas transcurridas, en las dos réplicas biológicas

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Réplica 1	0	0	1	4	10	18	24	31	40	49	49	47	47	47	46	46
Réplica 2	0	0	0	3	6	16	21	27	36	43	43	43	43	43	42	42
Total # de plantas	0	0	1	7	16	34	45	58	76	92	92	90	90	90	88	88

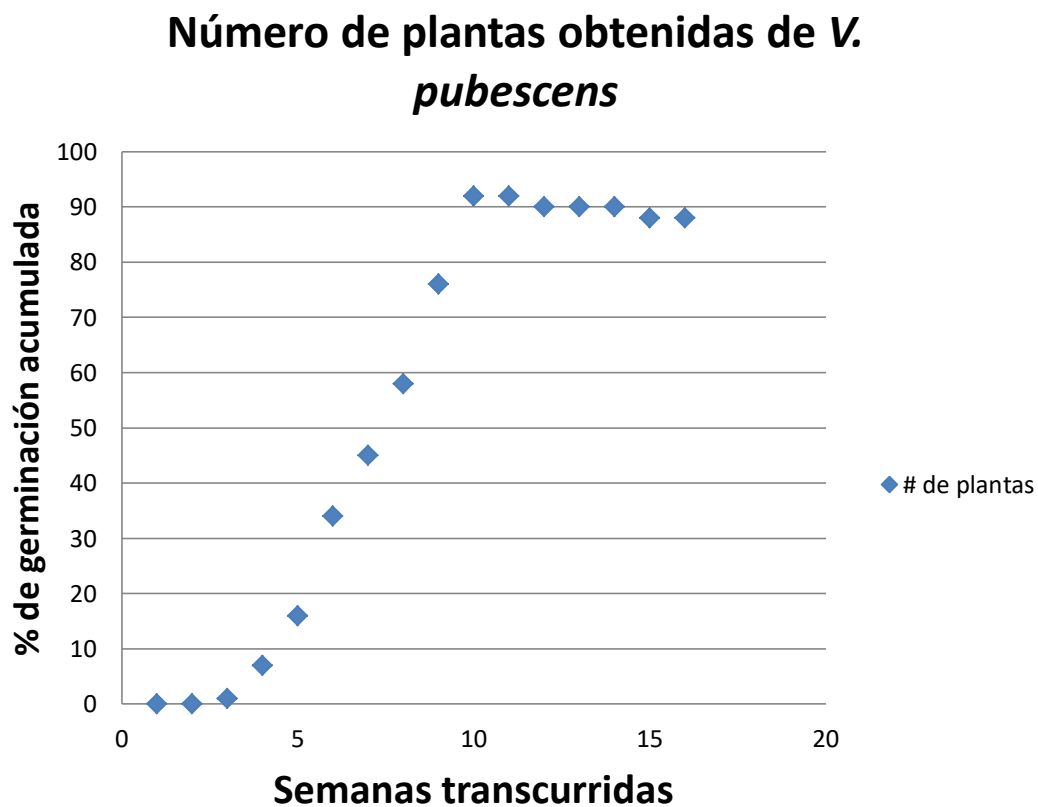


Figura 6. Porcentaje de germinación acumulada de plantas de *V. pubescens*, desde la semana 1 hasta la 16, entre las dos réplicas biológicas.

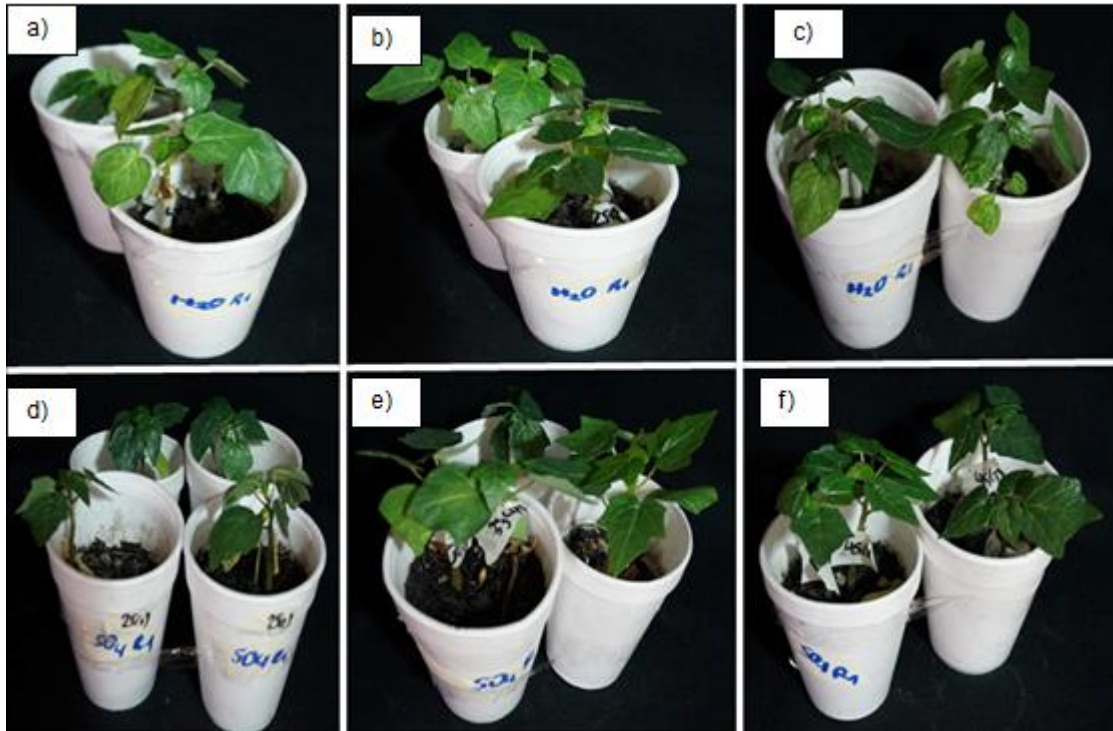


Figura 7. Plantas de *V. pubescens* utilizadas en el experimento, a las 16 semanas de crecimiento, antes del estrés térmico.

- a) Plantas tratadas con agua sometidas a 25 °C.
- b) Plantas tratadas con agua sometidas a 33,5 °C.
- c) Plantas tratadas con agua sometidas a 45 °C.
- d) Plantas tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sometidas a 25 °C.
- e) Plantas tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sometidas a 33,5 °C.
- f) Plantas tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sometidas a 45 °C.

La germinación de *V. pubescens* es considerada de dificultad media y se dice que puede tardar incluso hasta un mes. Se ha comprobado que, naturalmente en un ambiente de 25 °C promueve la germinación de las semillas entre 15 a 20 días. El sustrato ideal se afirma que debe ser una mezcla de tierra común junto con tierra vegetal y arena fina, de preferencia desinfectada (Espinosa, 2014). Al contrastar los resultados obtenidos, se reflejan algunas diferencias de lo obtenido con lo ideal. A pesar de que se usó tierra preparada autoclavada, y el riego de agua fue continuo pero no excesivo, sólo se registró una alta tasa de germinación de las plántulas a partir de la semana 6, ya que antes de este tiempo, de 150 semillas sembradas, tan solo habían germinado 16. Las plantas se colocaron en temperatura ambiente, por lo que el problema pudo radicar en

la viabilidad de las semillas. Según Benítez (2013), la viabilidad de las semillas se relaciona con la madurez del fruto, el cual se lo puede percibir de acuerdo al color amarillento del fruto a medida que está más maduro. Es muy probable que el fruto se encontrara a un 75 % de madurez, lo que significó el retraso de la germinación. Se han realizado pruebas in vitro para mejorar la germinación de *V. pubescens* aplicando KNO_3 (nitrato de potasio) y AG_3 (ácido giberélico), lo que promovió una germinación mayor, lo que se puede tomar en consideración en posteriores trabajos de investigación (Benítez et al., 2013, p.190). También, se infiere que la germinación acumulada de esta planta puede variar mucho de población en población, debido a que *V. pubescens* es una especie no domesticada. Las plantas que hoy en día se conocen como domesticadas, se basan en caracteres fijados a lo largo del tiempo, los cuales garantizan, una alta tasa de germinación, un mayor índice de cosecha, maduración de frutos, entre otros (Díaz, 2010). Las plantas no domesticadas presentan muchos genes deletéreos en heterocigosis, que no han sido eliminados. La heterocigosis también provoca que, la segregación de los caracteres favorables no se dé en una tasa constante (Benítez, 2005). Por lo que, en el caso de *V. pubescens*, la tasa de germinación acumulada varía, debido a que su genética silvestre (en el caso de la característica de germinación) influye directamente en este proceso.

6.2 Estandarización de los métodos de análisis bioquímicos

6.2.1 Método de concentración de la clorofila

Se realizaron pruebas para comprobar a cuántas horas se podía encontrar la mayor concentración de clorofila, para ser usada en los ensayos posteriores. A continuación se observan los resultados de las absorbancias encontradas a 2, 4, 8, 16, 24 y 48 horas (tablas 4 y 5).

Tabla 4.

Absorbancias obtenidas a 645 nm, de los tubos que conteían el sobrenadante vegetal con la clorofila presente, proveniente de hojas de *V. pubescens*.

	tubo 1 (a)	tubo 1 (b)	tubo 2 (c)	Promedio	tubo 2 (a)	tubo 2 (b)	tubo 2 (c)	Promedio
2 horas	0,109	0,121	0,121	0,117	0,143	0,17	0,17	0,161
4 horas	0,191	0,19	0,195	0,192	0,14	0,146	0,15	0,145
8 horas	0,167	0,169	0,173	0,169	0,127	0,132	0,129	0,129
16 horas	0,401	0,404	0,402	0,402	0,293	0,451	0,459	0,401
24 horas	0,151	0,144	0,149	0,148	0,191	0,19	0,213	0,198
48 horas	0,372	0,487	0,488	0,449	0,276	0,278	0,284	0,279

Tabla 5.

Absorbancias obtenidas a 663 nm, de los tubos que conteían el sobrenadante vegetal con la clorofila presente, proveniente de hojas de *V. pubescens*.

	tubo 1 (a)	tubo 1 (b)	tubo 2 (c)	Promedio	tubo 2 (a)	tubo 2 (b)	tubo 2 (c)	Promedio
2 horas	0,235	0,266	0,268	0,256	0,321	0,391	0,392	0,368
4 horas	0,44	0,441	0,452	0,444	0,313	0,325	0,34	0,326
8 horas	0,238	0,234	0,23	0,234	0,239	0,24	0,238	0,239
16 horas	0,174	0,176	0,174	0,174	0,133	0,193	0,196	0,174
24 horas	0,335	0,319	0,335	0,329	0,444	0,44	0,5	0,461
48 horas	0,163	0,207	0,208	0,192	0,139	0,126	0,129	0,131

Una vez obtenidas las absorbancias a 645 nm y 663 nm, se realizaron los cálculos con las ecuaciones 1 y 2 (Arnon, 1949) para cuantificar la cantidad tanto de clorofila *a* y *b* presentes en los sobrenadantes vegetales. A partir de los datos obtenidos, se realizó el cálculo final con las ecuaciones 3, 4, 5, 6, y 7 presentadas por Porra (2002) para obtener la concentración real de clorofila *a* y clorofila *b*. También se realizó el cálculo de los promedios finales entre los dos tubos y la desviación estándar (tablas 6 y 7).

Tabla 6.

Datos de la concentración de clorofila *a*, presente en los sobrenadantes vegetales que conteían la clorofila proveniente de hojas de *V. pubescens*.

[] real de clorofila <i>a</i>	Promedios tubo 1	Promedios tubo 2	Promedios Finales	Desviación estándar
2 horas	3,191	4,237	3,714	0,739
4 horas	5,660	4,402	5,031	0,889
8 horas	2,978	1,967	2,473	0,714
16 horas	4,954	4,938	4,946	0,011
24 horas	4,129	5,312	4,721	0,836
48 horas	5,521	3,403	4,462	1,497

Tabla 7.

Datos de la concentración de clorofila *b*, presente en los sobrenadantes vegetales que conteían la clorofila proveniente de hojas de *V. pubescens*.

[] real de clorofila <i>b</i>	Promedios tubo 1	Promedios tubo 2	Promedios Finales	Desviación estándar
2 horas	1,160	1,521	1,340	0,255
4 horas	1,786	1,404	1,595	0,270
8 horas	2,165	1,475	1,820	0,488
16 horas	5,141	5,124	5,132	0,012
24 horas	1,441	1,826	1,633	0,272
48 horas	5,733	3,586	4,660	1,518

A partir de las concentraciones reales de clorofila *a* y *b*, se evidenció que a las 16 horas de incubación se obtuvieron las más altas concentraciones de las mismas, así como la más baja desviación estándar (figuras 8 y 9) por lo que, para el ensayo biológico, se decidió reposar a la clorofila en etanol por un lapso de 16 horas en oscuridad.

Concentración de clorofila a versus el tiempo de reposo en la oscuridad

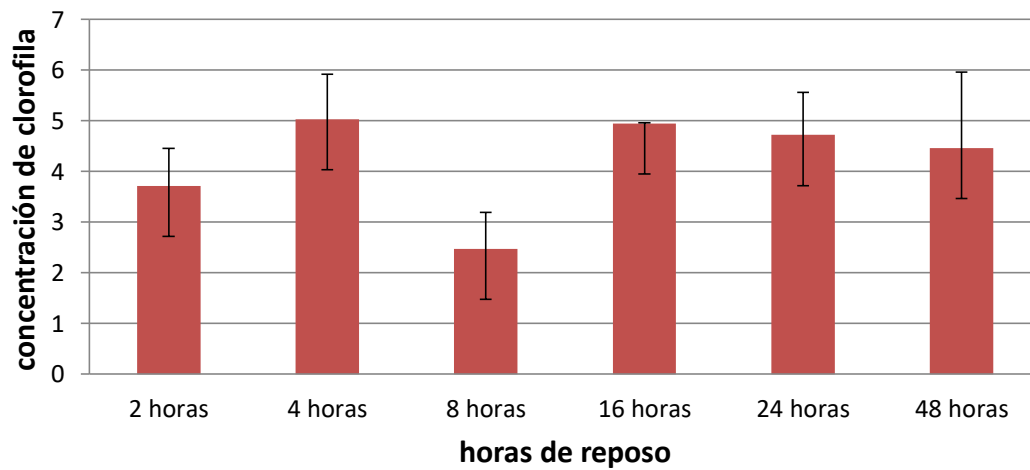


Figura 8. Concentración de clorofila a en los diferentes horas de almacenamiento en la oscuridad. Criterio para la elección del mejor tiempo de reposo para encontrar la mayor concentración real de clorofila a .

Concentración de clorofila b versus el tiempo de reposo en la oscuridad

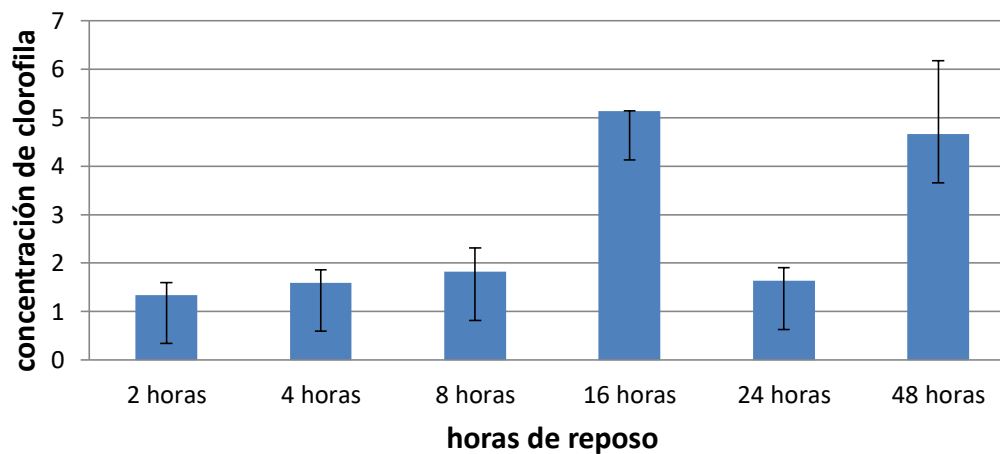


Figura 9. Concentración de clorofila b en los diferentes horas de almacenamiento en la oscuridad. Criterio para la elección del mejor tiempo de reposo para encontrar la mayor concentración real de clorofila b .

6.2.2 Método de pérdida de electrolitos

De manera general, se evidenció que la conductividad aumentó a medida que el tiempo de permanencia de los discos vegetales fue mayor. Comprobando de esa manera que los discos vegetales liberan electrolitos que aumentaron la conductividad en la solución de agua destilada. La conductividad del agua destilada que se registró fue de 1,34 $\mu\text{S}/\text{cm}$. También se observó una pérdida mayor de electrolitos cuando la temperatura de estrés fue mayor.

Los vasos de precipitación que contenían el agua con los discos vegetales (de las plantas que no recibieron sulfato de amonio) fueron autoclavados, y se obtuvieron conductividades de 106,8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (vaso de 33,5 °C) y 112,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (vaso de 45 °C). Con ese dato que representa el 100% de pérdida de electrolitos, se realizó el cálculo del porcentaje de pérdida de electrolitos, utilizando el dato de pérdida en $\mu\text{S}/\text{cm}$. A continuación en la tabla 8, se presenta la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y el porcentaje de pérdida de electrolitos que se determinaron en la solución de agua destilada con los discos vegetales de las plantas sometidas a estrés de 33,5 °C y 45 °C.

Tabla 8.

Conductividad generada en el agua por los electrolitos perdidos por los discos de hojas de *V. pubescens* que fueron sometidas a estrés térmico y que no recibieron el tratamiento de sulfato de amonio.

Tiempo de medición	Temperatura de estrés de la hoja (°C)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	% de pérdida de electrolitos	Temperatura del disco vegetal en solución (°C)
30 minutos	33,5	11,85	11,09	20,1
45 minutos	33,5	15,61	14,8	20,3
60 minutos	33,5	19,50	18,25	20,1
30 minutos	45	21,01	18,69	20,1
45 minutos	45	25,71	22,87	20,3
60 minutos	45	28,73	25,56	20,3

Después se realizó la medición de los electrolitos liberados por parte de los discos de hojas de plantas que tuvieron el tratamiento de 1 semana con sulfato de amonio. También se autoclavaron los vasos de precipitación que contenían el agua con los discos vegetales, y se obtuvieron conductividades de 97,8 $\mu\text{S/cm}$ (vaso de 33,5 °C) y 104,7 $\mu\text{S/cm}$ (vaso de 45 °C). Con ese dato (que representa el 100% de pérdida de electrolitos), se realizó el cálculo del porcentaje de pérdida de electrolitos, utilizando el dato de pérdida en $\mu\text{S/cm}$. A continuación en la tabla 9, se presenta la conductividad ($\mu\text{S/cm}$) y el porcentaje de pérdida de electrolitos, que se determinaron en la solución de agua destilada con los discos vegetales de las plantas sometidas a estrés de 33,5 °C y 45 °C.

Tabla 9.

Conductividad generada en el agua por los electrolitos perdidos por los discos de hojas de *V. pubescens* que fueron sometidas a estrés térmico y que sí recibieron el tratamiento de sulfato de amonio por 1 semana.

Tiempo de medición	Temperatura de estrés de la hoja (°C)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	% de pérdida de electrolitos	Temperatura del disco vegetal en solución (°C)
30 minutos	33,5	3,616	3,69	20,6
45 minutos	33,5	4,407	4,50	20,5
60 minutos	33,5	5,619	5,74	20,6
30 minutos	45	4,833	4,61	20,6
45 minutos	45	5,540	5,29	20,7
60 minutos	45	7,465	7,12	20,8

Al contrastar los resultados de la pérdida de electrolitos generada con plantas sin tratamiento de sulfato de amonio versus las que sí recibieron dicho tratamiento, se puede observar claramente que aquellas plantas que obtuvieron una fuente de Nitrógeno por una semana, fue suficiente para que exista una respuesta fisiológica diferente. Por lo tanto, se observó que las plantas

perdieron menos electrolitos cuando tienen una fuente de nitrógeno en su desarrollo. El porcentaje de pérdida de electrolitos de plantas con tratamiento de sulfato de amonio pero sin estrés térmico registro un promedio de 3,96 % $\mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que el promedio de la conductividad sin estrés y sin aplicación de sulfato de amonio fue de 5,189 %. Se encontraron temperaturas similares en las soluciones medidas, por lo que esta no fue una fuente de variación en la pérdida de electrolitos. Con estos resultados se procedió a realizar los ensayos en las réplicas biológicas, sabiendo que el tratamiento con sulfato de amonio por una semana no produce un efecto fisiológico negativo.

6.2.3 Método de actividad enzimática de la catalasa

A continuación se presentan en las tablas 10, 11, 12 y 13 las absorbancias a 240 ηm que generaron las diluciones del sobrenadante que contenía la enzima catalasa. Se trabajó con 990 μL de la solución de trabajo más 500 μL de peróxido de hidrógeno más 10 μL de la muestra diluída y la muestra al 100%.

Tabla 10.

Absorbancias obtenidas a 240 ηm provenientes del sobrenadante de muestra vegetal de *V. pubescens*. Sobrenadante concentrado al 100 %.

Tiempo de medición	# Repetición		
	1	2	3
10 segundos	1,692	2,206	2,157
30 segundos	1,673	1,880	2,128
50 segundos	1,70	1,872	2,114
70 segundos	1,665	1,860	2,094

Tabla 11.

Absorbancias obtenidas a 240 nm provenientes del sobrenadante de muestra vegetal de *V. pubescens*. Sobrenadante concentrado al 75 %.

Tiempo de medición	# Repetición		
	1	2	3
10 segundos	1,896	1,577	1,746
30 segundos	1,888	1,589	1,740
50 segundos	1,880	1,573	1,734
70 segundos	1,872	1,559	1,729

Tabla 12.

Absorbancias obtenidas a 240 nm provenientes del sobrenadante de muestra vegetal de *V. pubescens*. Sobrenadante concentrado al 50 %.

Tiempo de medición	# Repetición		
	1	2	3
10 segundos	1,456	1,514	1,346
30 segundos	1,426	1,498	1,337
50 segundos	1,410	1,482	1,335
70 segundos	1,397	1,462	1,322

Tabla 13.

Absorbancias obtenidas a 240 nm provenientes del sobrenadante de muestra vegetal de *V. pubescens*. Sobrenadante concentrado al 25 %.

Tiempo de medición	# Repetición		
	1	2	3
10 segundos	1,196	1,155	1,179
30 segundos	1,182	1,144	1,188
50 segundos	1,180	1,133	1,191
70 segundos	1,175	1,120	1,136

Una vez aplicada la fórmula 8, se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 14, donde se observan las actividades enzimáticas en unidades de actividad enzimática (U) por 100 mg de tejido vegetal y los promedios obtenidos.

Tabla 14.

Actividades enzimáticas obtenidas en las 3 mediciones hechas por cada dilución del sobrenadante vegetal proveniente de hojas de *V. pubescens*.

Concentración del sobrenadante vegetal	Actividad 1 (U)	Actividad 2 (U)	Actividad 3 (U)	Promedio (U)
100 %	2,7	-	6,3	4,5
75 %	2,4	1,8	1,7	1,9
50 %	3,9	5,2	1,5	3,5
25 %	2,1	3,5	-	2,8

Debido a que en la segunda medición de la muestra del sobrenadante al 100% y en la tercera medición de la muestra del sobrenadante al 25% se obtuvo datos atípicos, se descartó dicho cálculo para usarlo en el promedio final. Como se observa en la figura 10, la actividad enzimática tiende a ser mayor a medida que la concentración del sobrenadante es mayor. Se descartó el promedio del sobrenadante concentrado al 75 % por ser un dato atípico. Debido a los resultados presentados, se decidió utilizar en los ensayos biológicos una concentración del sobrenadante del 50%. Debido a que existe una tendencia lineal con un r^2 del 98%, se justifica que las absorbancias sean mayores a 1.

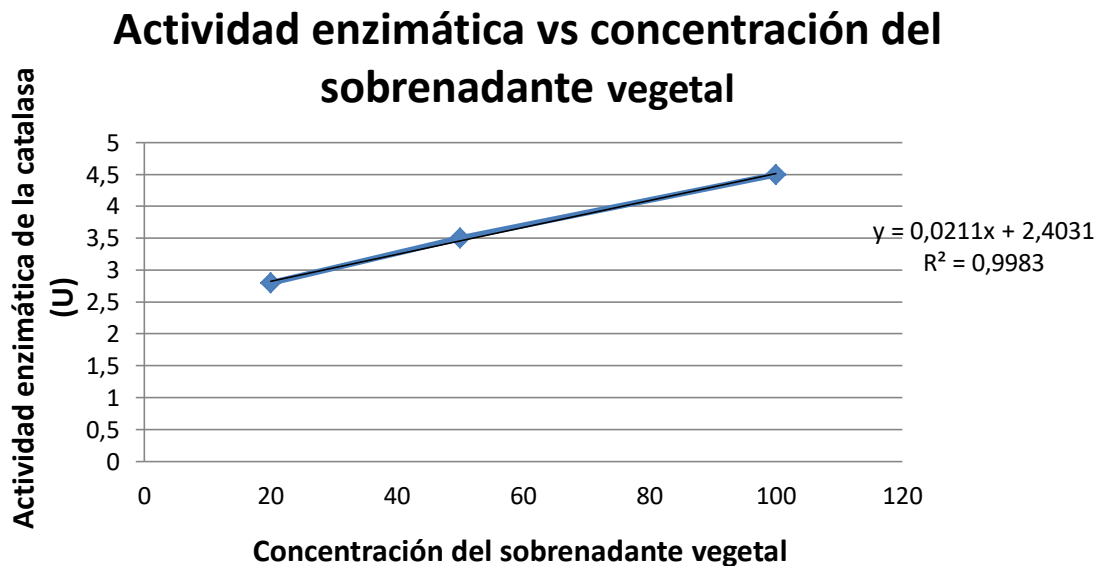


Figura 10. Actividad enzimática de la catalasa versus la concentración del sobrenadante vegetal.

6.3 Análisis de ensayos bioquímicos finales

6.3.1 Análisis de concentración de clorofila

Al obtener las concentraciones de clorofila *a* y *b*, se las analizó por separado. A continuación se detalla el análisis de cada una de ellas.

En el caso de la clorofila *a*, considerando las dos réplicas biológicas, tanto en el tratamiento con agua y en el tratamiento con sulfato de amonio, la concentración de clorofila *a* aumentó a medida que las temperaturas de estrés aumentaron (figura 11). La concentración de dicha clorofila tiene una tendencia de aumentar a medida que la planta se encontraba en una temperatura de estrés superior. En el caso del tratamiento con agua, la concentración de clorofila *a* se elevó más comparada con el tratamiento con sulfato de amonio, en donde se evidenció una concentración más estable.

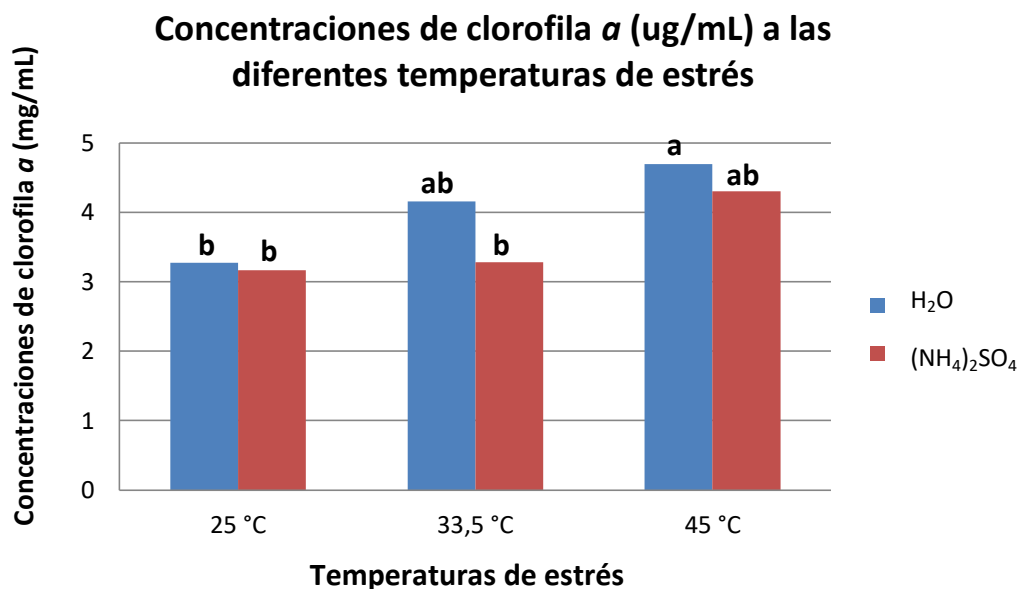


Figura 11. Concentraciones de clorofila a obtenidas a las 16 horas de almacenamiento en la oscuridad. Comparación de las concentraciones obtenidas en las diferentes temperaturas de estrés del tratamiento con agua (barra azul) versus el tratamiento con sulfato de amonio (barra roja). Concentraciones presentadas en unidades de μg de clorofila por mL de solución. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.01$

Para la variable “concentración de clorofila a ”, se observó que los datos eran normales con la prueba de Shapiro-Wilk (valor $p = 0.1249$), por lo tanto se realizó el test ANOVA (anexo 1), en donde se encontraron diferencias significativas muy bajas entre los tratamientos. La prueba de Duncan (anexo2) señala que, la concentración de clorofila a es estadísticamente igual en agua y sulfato de amonio a 45 °C, así como en agua a 33,5 °C. También, la concentración de clorofila a no tuvo diferencia significativa con la aplicación de sulfato de amonio. En agua si existieron diferencias significativas, ya que a 45°C, la concentración aumentó, comprando con los 25 °C.

Para la clorofila b , considerando las dos réplicas biológicas, como se observa en la figura 12, tanto en el tratamiento con agua y en el tratamiento con sulfato de amonio, la concentración real de clorofila b aumentó a medida que las temperaturas de estrés aumentaron. A diferencia de la clorofila a , en la clorofila b se observa que la concentración aumentó en menor medida. Se evidenció

que en el tratamiento con sulfato de amonio, la concentración de clorofila *b* aumenta de forma progresiva aunque ligeramente.

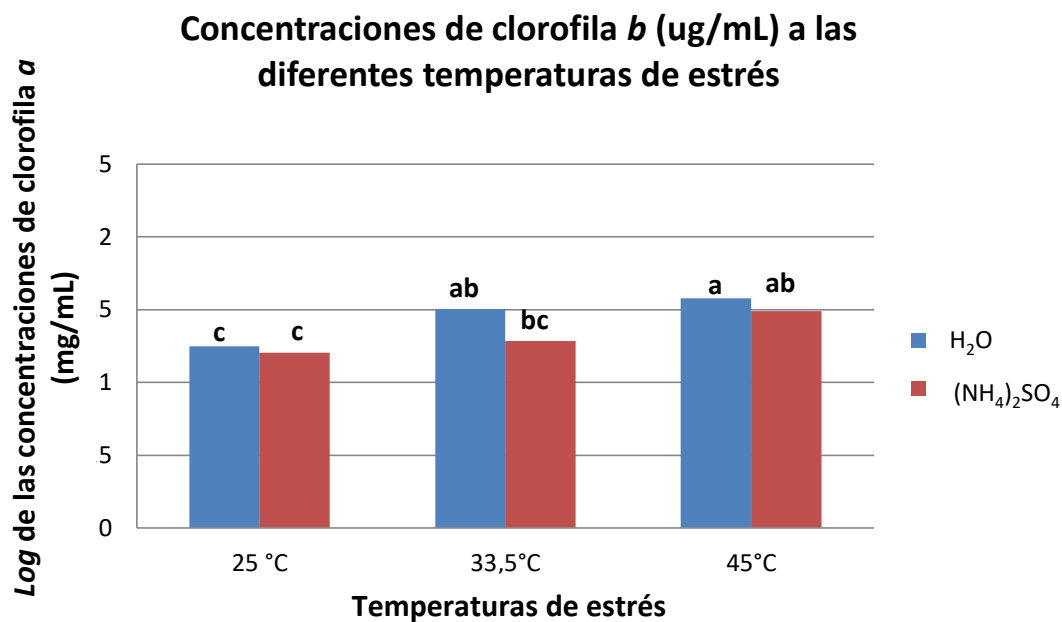


Figura 12. Concentraciones reales de clorofila *b* obtenidas a las 16 horas de almacenamiento en la oscuridad. Comparación de las concentraciones obtenidas en las diferentes temperaturas de estrés entre el tratamiento con agua (barra azul) versus tratamiento con sulfato de amonio (barra roja). Concentraciones presentadas en unidades de μg de clorofila por mL de solución. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.1$

Para el caso de la clorofila *b*, los datos no resultaron normales en la prueba de Shapiro-Wilk (valor $p = 0.004148$), por lo que se realizó un ajuste logarítmico, con la fórmula $\log(1+x)$, en donde x se refiere a la concentración de clorofila *b*. Con este ajuste realizado, mejoró la normalidad de los datos de forma sustancial (valor $p = 0.1339$). El test ANOVA (anexo 3) reflejó que existió una baja diferencia significativa entre tratamientos. La prueba de Duncan (anexo 4) mostró un comportamiento similar al observado en el análisis de la clorofila *a*, es decir, las plantas que recibieron el tratamiento con agua y las que recibieron sulfato de amonio y fueron sometidas a 45 °C arrojaron las más altas concentraciones, mientras que las plantas a 25 °C presentaron las concentraciones más bajas. Es interesante, recalcar la concentración de

clorofila *b* con sulfato a 33,5 °C es similar a la del agua a 25°C y sulfato a 25 °C, y todas estas son diferentes al agua a 33,5 °C.

La baja significancia encontrada demuestra que las concentraciones de las clorofilas no se vieron afectadas por los tratamientos con agua y sulfato de amonio, frente a las diferentes temperaturas de estrés. De esa manera, se evidencia que la concentración de sulfato de amonio agregada en las plantas, no representa una fuente de nitrógeno suficiente para fomentar un cambio en la síntesis de clorofila y que por ende, el estrés térmico afectó de una manera similar a los fotosistemas en las plantas de *V. pubescens*. Es interesante precisar que las concentraciones tanto de clorofila *a* y *b*, incrementaron a medida que la temperatura de estrés era mayor.

Esta respuesta de incremento de la clorofila se ha presentado en un estudio del tomate, en el cual se comparó la variedad “Campbell-28” versus la variedad “Nagcarlang”, y se determinó que en la variedad “Campbell-28” existió un incremento en la tasa fotosintética cuando fue sometida a 45°C durante 2 horas, en comparación al control, que fue sometido a 25°C. Se observó que la clorofila inicial fue la que aumentó a medida que el estrés térmico fue mayor, probablemente por que existió una alteración en la captación de energía (Camejo et al., 2005, p.286). Los autores señalaron que si la fluorescencia final disminuye, se debe a que existió daño en el fotosistema II (como ocurrió en la variedad “Campbell-28”). Sin embargo, si la clorofila final no disminuye y se mantiene constante (como ocurrió en la variedad “Nagcarlang”), podría atribuirse a una resistencia de la planta. También se observó que, posterior al estrés la variedad “Nagcarlang” poseía un menor ratio de clorofila *a/b*. La variación en el ratio de clorofila *a/b* puede ser un indicador de resistencia, ya que la disminución de la absorción de luz se considera un mecanismo para proteger a los cloroplastos y así sobrevivir bajo condiciones poco favorables en exposición prolongada (Camejo et al., 2005, p.286). De acuerdo a los resultados presentados por Camejo, se puede contrastar que la *V. pubescens* podría tener una tolerancia al estrés térmico ya que si las concentraciones

tanto de clorofila *a* y *b* no disminuyeron, puede deberse a su capacidad termotolerante. La variedad “Nagcarlang” es silvestre igual que *V. pubescens*, por lo que existe una similitud en su comportamiento.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta el tiempo del estrés, que en este estudio fue de 4 horas y en el tomate de 2 horas. Dicho tiempo de estrés podría significar hasta que punto la termotolerancia se presenta. Un estudio en cítricos (*C. unshiu Marc* y *C. sinensis Osbeck*), reveló que si existe una disminución de clorofila en altas temperaturas cuando las plantas fueron sometidas por largos períodos de estrés térmico (15 días) y sólo una vez que el estrés haya sobrepasado el umbral de la termotolerancia de la planta, se provocará una disminución en la capacidad fotosintética (Guo, Zhou y Cheng, 2006, p.266). Esto podría demostrar que la capacidad fotosintética de *V. pubescens* se mantiene estable cuando el tiempo de estrés térmico no supera las 4 horas, sin embargo se desconoce si las concentraciones de clorofilas *a* y *b* hubiesen disminuido a mayor tiempo de estrés. En este caso se eligió 4 horas de estrés térmico, ya que en un análisis previo de este trabajo se demostró que este tiempo fue suficiente para generar estrés a nivel proteico. Por otra parte, una investigación en el frijol (*Phaseolus vulgaris*) también demostró que la concentración de la clorofila aumenta hasta temperaturas de 35 °C, es decir, se encontró que los fotosistemas se mantenían activos por lo que al parecer, dependiendo de la especie, temperaturas de 35 °C no representan un estrés térmico (Pastenes y Horton, 1996, p.1250). En la metodología usada con *V. pubescens*, se la sometió a 33,5 °C como temperatura intermedia, por lo que a futuro, se podría evaluar una temperatura media superior.

Finalmente, se puede analizar por qué las concentraciones de clorofilas no se vieron afectadas entre tratamientos. En la investigación de Garbin y Dillenburg (2008, p.300), se analizó el efecto de la aplicación de diferentes fuentes de nitrógeno, para evaluar el crecimiento y la concentración de clorofila en *Araucaria angustifolia*. Se determinó que concentraciones de nitrógeno de 4 mM, provenientes de fuentes de nitratos y amonios si son capaces de

incrementar la concentración de clorofila (comparado con el grupo control). Sin embargo, señalan que la concentración 4 mM inclusive pudo ser excesiva. También concluyeron que fuentes de amonio permiten un mejor crecimiento vegetal en etapas tempranas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo señalan que, probablemente el sulfato de amonio no es la fuente adecuada para *V. pubescens* para que aumente la concentración de clorofila y, que al menos en esa concentración, no se encontró una diferencia tan significativa frente al tratamiento con agua. Al analizar el efecto del sulfato de amonio, se puede deducir que, cuando dicho compuesto se usa como fertilizante, su concentración aporta un 21% de N en total, lo que provoca la nitrificación en el suelo y a la larga, la absorción y su uso en la síntesis de clorofila (IPNI, 2012). Este uso agrícola del sulfato de amonio está comprobado por lo que, al bajar la concentración (que en este caso fue 6mM), se podría inferir que al estar menos concentrado el sulfato de amonio, la cantidad de Nitrógeno absorbido no es la suficiente para promover una mayor síntesis de clorofila, comparandola con el tratamiento con agua. Sin embargo, como la concentración de clorofila (*a* y *b*) no decayó, se puede relacionar el aporte del sulfato de amonio en otros procesos que fomentaron una cierta termotolerancia.

6.3.2 Análisis del porcentaje de pérdida de electrolitos

En la figura 13, se observa el resumen de los datos obtenidos del porcentaje de electrolitos perdidos en todas las temperaturas y repeticiones biológicas. A medida que trascurría el tiempo la pérdida de electrolitos fue mayor. Por otro lado, se observa que el tratamiento con sulfato de amonio permitió que se pierdan menos electrolitos comparado con el tratamiento con agua. Los datos finales del porcentaje de pérdida de electrolitos, representan el promedio de los tiempos (0, 30 y 60 minutos) en los que se realizaron las mediciones.

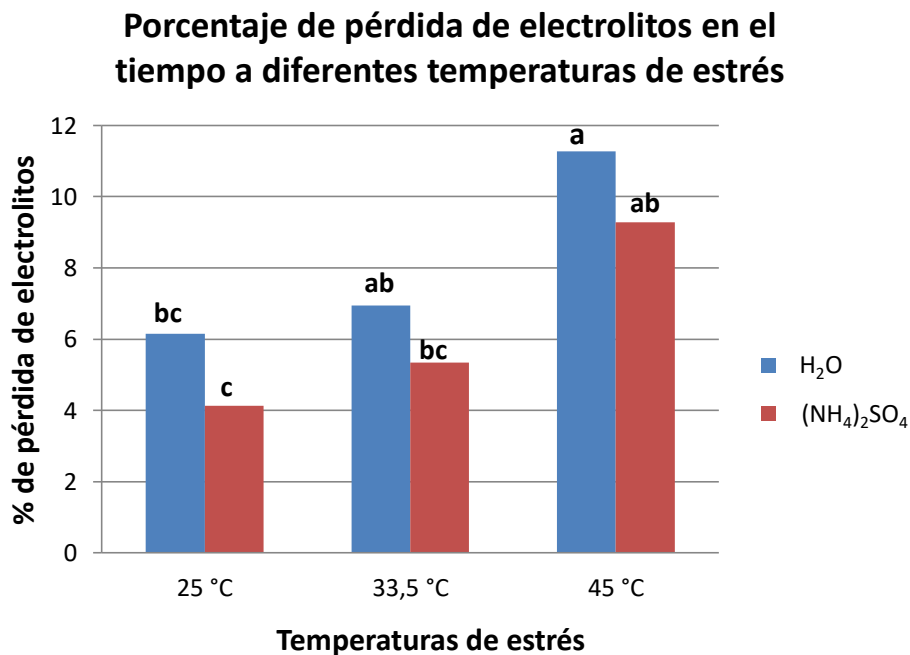


Figura 13. Porcentaje de pérdida de electrolitos en el tiempo a diferentes temperaturas de estrés. Datos de las medias obtenidas a los 0, 30 y 60 minutos a los que se realizó la medición. Por cada temperatura se presentan el tratamiento con agua (barra azul) versus el tratamiento con sulfato de amonio (barra roja). Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.1$.

Al analizar el porcentaje final de la pérdida de electrolitos, se comprobó que los datos presentaron normalidad, con la prueba de Shapiro-Wilk (valor $p = 0.3934$). El ANOVA (anexo 5) indicó que sí existieron diferencias significativas entre los tratamientos, entre los tiempos, pero no existieron entre la interacción tiempo por tratamiento. La prueba de Duncan (anexo 6) señaló que los datos presentaron coherencia en el tiempo, es decir, a mayor tiempo transcurrido, mayor fue la pérdida de electrolitos. Los datos, en función de los tratamientos, indicaron que a 45 °C, no existieron diferencias significativas, por lo que con agua y con sulfato de amonio se perdieron electrolitos de manera similar. Después se confirmó que con el tratamiento de sulfato de amonio, las plantas en 25 °C y 33,5 °C perdieron menos electrolitos que con el tratamiento con agua. Resultando así que el sulfato de amonio permitió una mayor termotolerancia en las plantas hasta una temperatura de 33,5 °C (donde existió significancia), comparado con el tratamiento con agua.

Los resultados del porcentaje de pérdida de electrolitos demostraron coherencia en la pérdida mostrada en el tiempo, y de forma positiva se refleja que el tratamiento con sulfato de amonio, evitó que las plantas perdieran de forma excesiva electrolitos, en comparación con las plantas regadas con agua únicamente. Una investigación realizada en maíz, reveló que la pérdida de electrolitos es mayor cuando las plantas son sometidas a períodos de estrés térmico largos (de 30 a 70 horas). Los investigadores hallaron que en las hojas de maíz, las temperaturas extremas desestabilizan la integridad de la membrana celular, que es lo que provoca dicha pérdida de electrolitos. Las membranas pierden estabilidad porque las ROS atacan los lípidos de las membranas (Restrepo et al., 2013, p. 260). Por lo tanto, se podría inferir que las plantas de *V. pubescens* asimilaron de forma positiva el tratamiento con sulfato de amonio, lo que le brindó una estabilidad a las membranas celulares, lo que eventualmente permitió una menor pérdida de electrolitos frente a las altas temperaturas, comparado con el tratamiento con agua. Probablemente, la concentración de Nitrógeno que el sulfato de amonio brindó a las plantas, fue la necesaria para que aumente el N en las membranas celulares. Dentro de las membranas celulares se encuentran glúcidos y proteínas, que son moléculas orgánicas compuestas por Carbono, Oxígeno e Hidrógeno, pero también de Nitrógeno y Fósforo. Por lo tanto, el sulfato de amonio (6mM) debió brindar la cantidad de N necesaria para fomentar la formación de estos componentes de la membrana celular. La importancia biológica de estas moléculas orgánicas radica en que confieren una estructura celular, es decir, mayor estabilidad en la membrana (Ministerio de Educación de España, 2011). Dicha estabilidad promovió una menor fuga de electrolitos.

El mencionado porcentaje de pérdida de electrolitos, en la mayoría de análisis no sobrepasó del 12%. Se infiere que a pesar de que las plantas se encontraron a 33,5 °C y 45 °C, el tiempo de estrés no fue tan prolongado, ya que periodos prolongados a temperaturas de 45°C, provocan la muerte vegetal. Sin embargo, sí se observó que a 45°C, la pérdida fue mayor que en las otras temperaturas, sin importar el tratamiento. Este análisis fue importante realizarlo

para evaluar la tolerancia de la planta, la misma que fue proporcional a la termoestabilidad de sus membranas celulares.

Las plantas, a pesar de que poseen mecanismos de protección frente a elevadas temperaturas, éstos solo son eficientes cuando los cambios son moderados. En caso de que la temperatura se eleve demasiado, el mecanismo de los estomas se descontrola, y la pérdida de agua se produce (Nava, 2013, p.250). Es interesante relacionar la pérdida de electrolitos con el daño en el aparato fotosintético. Así lo reporto una investigación en fresa, en la cual se evidenció que una mayor pérdida de electrolitos estaba relacionada con una menor tasa de fotosíntesis (Martínez, 2014). En el caso de *V. pubescens*, al relacionar estos parámetros se evidencia que las 4 horas de estrés térmico fueron suficientes para producir una pérdida de electrolitos moderada (aunque la pérdida fue mayor a 45 °C), pero no fueron suficientes para promover una menor concentración de clorofila.

6.3.3 Análisis de la actividad enzimática de la catalasa

Como se observa en la figura 14, la actividad de la catalasa en el tratamiento con agua, decreció progresivamente a medida que la temperatura de estrés fue aumentando. Por lo tanto, la actividad de la catalasa se vio afectada por un aumento en la temperatura cuando las plantas de *V. pubescens* fueron regadas sólo con agua. También, se evidenció que las plantas de *V. pubescens* que fueron regadas con sulfato de amonio, arrojaron datos de actividad catalasa estable frente a las diferentes temperaturas de estrés. Al parecer, las plantas que recibieron el tratamiento con sulfato de amonio, lograron desarrollar termotolerancias que, a la larga les permitió mantener estable la actividad de la catalasa. Gráficamente, se observa el efecto positivo de la aplicación de sulfato sobre la actividad de la catalasa en relación con la temperatura.

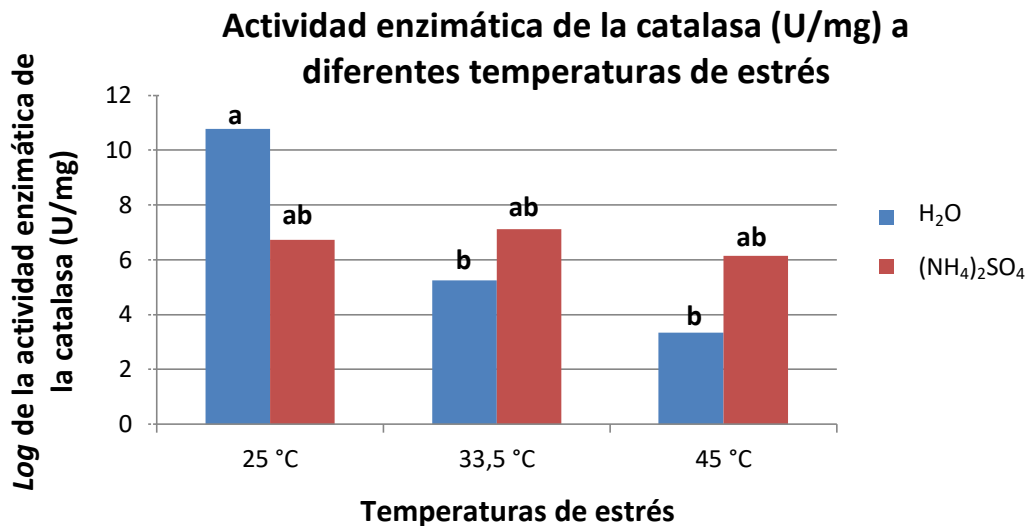


Figura 14. Actividades enzimáticas de la catalasa (U/mg). Comparación de las actividades obtenidas en las diferentes temperaturas de estrés entre el tratamiento con agua (barra azul) versus tratamiento con sulfato de amonio (barra roja). Actividades presentadas en unidades de actividad enzimática de la catalasa por cada 100 mg de tejido foliar. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.1$.

Al obtener las actividades de la catalasa, se juntaron los datos de las dos réplicas biológicas y se analizó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Se comprobó que los datos no eran normales (valor $p = 1.467e-10$), por lo que se realizó un ajuste logarítmico con la fórmula $\log(1+y)$, donde y es la actividad de la catalasa. El test ANOVA (anexo 7) señaló que sí existieron diferencias significativas entre los tratamientos. La prueba de Duncan (anexo 8) señaló que el sulfato de amonio a 25 °C a 33,5 °C y a 45 °C es estadísticamente igual. Mientras que la actividad en el tratamiento con agua bajó significativamente, comparando el control versus temperaturas de 33,5 °C y a 45 °C. Esto indica que el tratamiento con sulfato de amonio proporcionó a los tejidos de la planta una mayor termotolerancia, por lo que al encontrarse frente a temperaturas de estrés, la catalasa tuvo una actividad proporcional. Resulta así que el tratamiento con sulfato de amonio permite que la actividad de la catalasa no disminuya demasiado frente a elevadas temperaturas, incluso en 45 °C.

Al evidenciar que la actividad de la catalasa fue afectada por el cambio de temperatura, se puede discutir ciertos parámetros. Se ha reportado que la catalasa es insensible al frío y a temperatura ambiente, en análisis hechos en hojas de pitahaya y menta. También existen análisis en hojas de nuez vómica (*Strychnos nux-vomica*) que han demostrado una alta actividad de la catalasa en ambientes fríos (Martínez et al., 2013, p.63). Evidentemente, el estrés que se genere por una temperatura extrema dependerá de factores como la especie y la fisiología vegetal. En este caso, la temperatura de estrés era alta, y con el control (agua) se evidenció que en hojas de *V. pubescens*, la actividad catalasa sí es sensible al aumento de temperatura. A pesar de que el incremento de temperatura fomenta la actividad enzimática, si se sobrepasa el umbral del nivel óptimo, la actividad decrece. Esto se debe a que se producen cambios (roturas de enlaces) en la estructura de la proteína, que disminuye considerablemente su actividad, provocando que se desnaturalice (Cerón et al., 2012, p.552). Se conoce que temperaturas superiores a los 45 °C provoca la disminución de la actividad catalasa. Es por ello que, a dicha temperatura, la actividad de la catalasa bajó considerablemente, comparada con la actividad a temperatura control (25°C) y con la temperatura media (33,5°C) de estrés. Las temperaturas frías en extremo provocan el mismo efecto. Por lo tanto, al analizar el estudio realizado en la pitahaya, en donde se observó que la catalasa era insensible al frío, probablemente la temperatura no fue lo suficientemente extrema para provocar cambio en la actividad enzimática, como sí ocurrió en el caso de la *V. pubescens*, donde a los 45°C, al ser una temperatura extrema alta, si se modificó dicha actividad. Los 33,5 °C es una temperatura que, en días calurosos puede presentarse, y las mismas plantas pueden estar acostumbradas, ya que la actividad enzimática que se observó fue estable.

Una vez que se comprobó que el aumento de la temperatura si provoca cambios en la actividad de la catalasa, se contrastaron los resultados obtenidos en el tratamiento con sulfato de amonio. Para las tres temperaturas analizadas, se comprobó que la actividad de la catalasa no tuvo diferencias significativas, lo

que hace ver que el sulfato de amonio con una dosis de 6 mM ayudó en la termotolerancia de *V. pubescens*. Existe un estudio, en el cual se sometieron diferentes especies vegetales a diferentes tipos de estrés oxidativo, entre ellos el calor. La investigación demostró que los diferentes tipos de estrés fomentaron el incremento de la concentración de H_2O_2 , lo que a la larga provocó la directa disminución de la catalasa (Shim et al., 2003, p.287). En este caso, con el tratamiento de sulfato de amonio, la actividad de la enzima no disminuyó, por lo que se evidencia que los elementos brindados por el sulfato de amonio, fortalecieron la fisiología vegetal. La investigación de Wang, et al (2008) reveló que, cuando la *Andropogon geredii* recibió fuentes de N y posteriormente se la sometió a estrés térmico, conservó una mayor biomasa en comparación con las que no recibieron dicho tratamiento, y a la larga presentaron mejores resultados de termotolerancia. Al analizar el efecto del sulfato de amonio en *V. pubescens*, se puede inferir que las plantas al recibir una fuente de N adecuada, conservaron mayor biomasa, y por ende, mayor cantidad de enzimas. También, se puede inferir que la fuente de N permitió una mayor síntesis de aminoácidos que forman dichas enzimas, lo que evitó una pérdida elevada de la actividad enzimática. El resultado tiene lógica, ya que una actividad muy alta de la enzima, podría significar que la planta estuvo muy estresada y necesitaba compensar dicho estrés. En este caso, la actividad estable permite entender que la planta no sentía excesivo estrés frente a las altas temperaturas, por lo que se evidencia una respuesta fisiológica positiva en el aumento de la termotolerancia, gracias al tratamiento con el sulfato de amonio.

Es importante mencionar que el hecho de que la actividad enzimática no haya bajado, representa una estabilidad frente al estrés. Esto debido a que una investigación en algunos genotipos de trigo reveló que la actividad catalasa bajó significativamente cuando el trigo fue expuesto a estrés térmico. Es interesante ver que en aquellos genotipos de trigo que no poseían termotolerancia, también disminuyó significativamente la concentración de clorofila (Almeselmani, Deshmukh y Sairam, 2006, p.384). Esta correlación

entre disminución de actividad catalasa y concentración de clorofila demuestra que en las plantas de *V. pubescens*, ocurrió un comportamiento lógico, ya que al no bajar la actividad catalasa con sulfato de amonio, tampoco bajó dicha concentración foliar de clorofila (en el caso de los tratamientos con sulfato, a temperaturas de 33,5 °C y 45 °C).

Debido a que la catalasa tiene una actividad enzimática antioxidante, cabe señalar que comparte labores con las enzimas superóxido dismutasa peroxidasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa. Probablemente, un análisis de la actividad de estas enzimas, complemente mejor la evaluación del estrés térmico en *V. pubescens*. En un estudio realizado en *Brassica juncea*, se reveló que en los genotipos tolerantes, el nivel basal de estas enzimas antioxidantes se mantuvieron estables posterior al estrés a 45°C (Rani et al., 2013, p.1). Por lo tanto, es interesante saber que de acuerdo a la bibliografía investigada, se podría inferir que la *V. pubescens* si es una especie que posee una termotolerancia, la misma que podría ser potenciada con adecuados tratamientos, como en este caso, el sulfato de amonio en concentración 6 mM.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar con éxito este trabajo investigativo, se presentan las siguientes conclusiones y recomendaciones.

7.1 Conclusiones

El sulfato de amonio en una concentración 6 mM si tuvo influencias significativas en la respuesta de plántulas de *V. pubescens* a temperaturas elevadas.

La aplicación de sulfato de amonio [6 mM] permitió que las plantas de *V. pubescens* pierdan menos electrolitos posterior al estrés térmico. Por lo tanto, modificó de manera significativa a la termoestabilidad de las membranas celulares, en comparación con las plantas regadas con agua únicamente.

Las concentraciones de clorofila variaron ligeramente con el tratamiento de sulfato de amonio. Por lo tanto, dicha concentración no afectó drásticamente en la tasa fotosintética posterior a la exposición a las altas temperaturas. Se observó que *V. pubescens* es una especie vegetal que posee una resistencia parcial frente a dicho estrés.

La actividad de la enzima catalasa se vio afectada por las altas temperaturas, ya que su actividad decreció proporcionalmente a mayores temperaturas. Dicha actividad se mantuvo estable en las plantas de *V. pubescens* que recibieron el tratamiento con sulfato de amonio. Por lo tanto, promueve una termotolerancia que eventualmente, evita el descenso de la actividad antioxidante de la enzima catalasa.

El sulfato de amonio ha demostrado que tiene el potencial para ser investigado como un compuesto que aporta en la termotolerancia, en el caso del chamburo. El sulfato de amonio provocó cambios significativos en las tres pruebas

bioquímicas realizadas en este trabajo. Por lo que se concluye que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tiene la capacidad de promover la estabilidad de la actividad catalasa, y también de evitar pérdidas excesivas de electrolitos cuando las plantas han sido sometidas a estrés térmico. Sin embargo, hace falta más pruebas para comprobar su efectividad.

La *V. pubescens* ha demostrado que posee una relativa tolerancia a las altas temperaturas, debido a que a los 45°C, no se observó una reducción en la concentración de clorofila. Por otro lado, esta especie tiene el potencial biotecnológico para ser evaluado con otros análisis bioquímicos e inclusive a nivel genético, ya que se observó procesos fisiológicos positivos frente a elevadas temperaturas que le provocaron estrés.

7.2 Recomendaciones

Analizar si es que el efecto del sulfato de amonio sirve para proteger a las plantas contra estrés generado por la parte biótica del ambiente que las rodea. Así como el estrés abiótico influye en el desarrollo vegetal, de igual manera las plagas como insectos e inclusive otras plantas deterioran la calidad de los cultivos, por lo que se puede hacer una investigación sobre cómo el sulfato de amonio puede aportar o no a la tolerancia al estrés biótico.

Probar otras concentraciones de sulfato de amonio y así evaluar si el efecto de termotolerancia aumenta o disminuye. Se recomienda que la concentración del sulfato de amonio sea menor, ya que en aras de utilizar dicha sustancia como un potenciador de la termotolerancia, la concentración de sulfato de amonio (6 mM) debería ser menor a la probada en esta investigación. Si la concentración fuese superior a la indicada, se estaría utilizando al sulfato de amonio como un fertilizante y no como mejorador de la tolerancia al estrés térmico. La tendencia actual sugiere que el uso de los fertilizantes en base de azufre debe disminuir para evitar la eutrofización a largo plazo.

Las 4 horas de estrés térmico a las que fueron sometidas las plantas en este trabajo experimental, si provocaron un estrés en las plantas. Sin embargo, su efecto no necesariamente sería igual que mayores tiempos de estrés térmico. Por lo tanto sería recomendable evaluar el comportamiento de esta planta en diferentes tiempos de estrés tanto mayores y menores, para poder definir con exactitud el nivel de tolerancia que tiene esta especie frente a las elevadas temperaturas.

8. REFERENCIAS

- Acosta, K., Jorge, E., Zavala, C. (1996). Proteínas de unión a DNA. Recuperado el 18 de Octubre de 2016 de <http://www.cirbiomedicas.uady.mx/revbiomed/pdf/rb96736.pdf>
- Almeselmani, M., Sairam, R., Deshmukh, P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. Recuperado el 23 de Octubre de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/230861178_Protective_role_of_antioxidant_enzymes_under_high_temperature_stress
- Bajji, M., Kinet, J., Lutts S. (2009). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. Recuperado el 16 de Septiembre de 2016 de <http://www.plantstress.com/methods/CMS%20drought-%202001.pdf>
- Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Gregory J. Gatto, Jr. Biochemistry. SEVENTH EDITION. W. H. Freeman and Company. 41 Madison Avenue. New York, NY 10010.
- Benítez, A. (2005). Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética en Plantas. Editorial:Reverté. España
- Benítez, S., Lobo, M., Delgado, O., Medina, C. (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2016 de <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/407/323>

- Caetano, Creucí Maria, Lagos Burbano, Túlio César, Sandoval Sierra, Claudia Lorena, Posada Tique, César Augusto, & Caetano Nunes, Diego Geraldo. (2008). Citogenética de especies de *Vasconcellea* (*Caricaceae*). Recuperado el 11 de Septiembre de 2016 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122008000400004&lng=en&tling=es
- Calviño, P., Echeverría, H., Redollati, M. (2002). DIAGNOSTICO DE NITROGENO EN TRIGO CON ANTECESOR SOJA BAJO SIEMBRA DIRECTA EN EL SUDESTE BONAERENSE. Recuperado el 6 de Noviembre de 2016 de http://www.suelos.org.ar/publicaciones/vol_20n1/calvi%F1o_36-42.pdf
- Calvo, M. (2009). *Clorofila*. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/clorofila.html>
- Camejo, D., Rodríguez, P., Morales, A., J., Torrecillas, A., Alarcón, J. (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. Recuperado el 5 de Noviembre de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161704001701>
- Cerón, A., Vargas, I., González, G., Islas, M., Martínez, M. (2012). Respuesta del sistema antioxidante enzimático de calabaza zucchini bajo estrés térmico por aplicación de oligoglucanos. Recuperado el 11 de Noviembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/pdf/339/33925376012.pdf>
- Chen, L., Cheng, L. (2009). Photosystem 2 is more tolerant to high temperature in apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves than in fruit peel. Recuperado el 8 de Noviembre de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11099-009-0017-4>
- Díaz, P. (18 de septiembre de 2012). Preocupación por pérdida de cultivos. *La Hora*. Sección país. p. 16

- Díaz, F. (2010). El proceso de domesticación de las plantas. *Revista Tiempo*. 28, 66-70.
- Espín, O. (7 de enero de 2010). Activan y desactivan genes, así combaten las plantas al frío. *Ciencia plus*. Sección laboratorio. p. 10.
- Espinosa, I. (2014). GERMINACIÓN, MICROINJERTACIÓN Y CULTIVO DE CALLOS IN VITRO DE *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo Y *Vasconcellea pubescens* A.DC. Recuperado el 5 de noviembre de 2016 de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/53339/Documento_completo.pdf-PDFA-U.pdf?sequence=3
- Frutipedia. (2009). MOUNTAIN PAPAYA. (*Vasconcellea pubescens*). Recuperado el 1 de diciembre de 2016 de http://www.fruitipedia.com/mountain_papaya.htm
- Garbin, M., Dillenburg, L. (2008). Effect of different nitrogen sources on growth, chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202008000400005
- Hatfield, J., Boote, K., Kimball, B., Ziska, L., Izaurralde, R., Ort, D., Thomson, A., Wolfe, D. (2011). Climate Impacts on Agriculture: Implications for Crop Production. Recuperado el 10 de Septiembre de 2016 de <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2355&context=usdaarsfacpub>
- Hassan, M., Gomaa, N., Fahmy, G., González, L., Hammouda, O., Atteya, A., (2014). Interactions between *Sonchus oleraceus* L. and some weeds in agroecosystems in Egypt. Recuperado el 2 de Diciembre de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178314000475>

- Hernández, F. (2011). Análisis de la agricultura en el trópico. Recuperado el 23 de Septiembre de 2016 de http://www.agro-tecnologia-tropical.com/agricultura_en_el_tropico.html
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*. Recuperado el 19 de Septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956698>
- Jarillo, J., Piñeiro, M. (2015). H2A.Z mediates different aspects of chromatin function and modulates flowering responses in Arabidopsis. Recuperado el 13 de Septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943140>
- INAMHI (2007). Gestión del Cambio Climático en el Ecuador. Recuperado el 1 de diciembre de 2016 de http://www.serviciometeorologico.gob.ec/wpcontent/ForosClimaticos/Foros%20Regionales/XI%20Foro/MAE_03.pdf el 01/12/16
- IPNI. (2012). Sulfato de amonio. Recuperado el 25 de Enero de 2017 de [https://www.ipni.net/publication/nsses.nsf/0/794F6BDB7E84EA4785257BBA0059C154/\\$FILE/NSS-ES-12.pdf](https://www.ipni.net/publication/nsses.nsf/0/794F6BDB7E84EA4785257BBA0059C154/$FILE/NSS-ES-12.pdf)
- Jha, U., Bohra, A., Singh, N. (2014). Heat stress in crop plants: its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbr.12217/abstract>
- Jordán, M. (2001). Adaptaciones de plantas a estrés abiótico que les permiten vivir y prosperar en diferentes condiciones ambientales. Recuperado el 19 de Noviembre de 2016 de <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=++%3E++16&tc=3&nc=5&art=11>

05

- Kumar, S., Wigge, P. (2010). H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. Recuperado el 14 de Septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079334>
- Lara, W., Korndorfer, G., Motta, S. (1997). VOLATILIZAÇÃO DE N-NH₃ NA CULTURA DE MILHO: I. EFEITO DA IRRIGAÇÃO E SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA URÉIA POR SULFATO DE AMÔNIO. Recuperado el 2 de Diciembre de 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06831997000300018&script=sci_abstract&tIng=pt
- Lau, C.; Jarvis, A.; Ramírez, J. (2011). Agricultura colombiana: Adaptación al cambio climático. Recuperado el 13 de Septiembre de 2016 de http://dapa.ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/02/politica_sintesis1_colombia_cambio_climatico.pdf
- Martínez, R. (2014). Caracterización de parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) variedad Albión, sometidas a diferentes concentraciones de Cadmio. Recuperado el 1 de diciembre de 2016 de <http://www.bdigital.unal.edu.co/42989/1/790789.2014.pdf>
- Martínez, M., Álvarez, O., Beryl, M., Rodríguez, J., Ramírez, S. (2013). ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MENTA (*Mentha piperita* L.) ALMACENADA BAJO REFRIGERACIÓN. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v24n01_057.pdf
- Martins, A. Díaz, P. (1 de enero de 2014). La temperatura global "aumentará 4 grados en 2100. *BBC*. Sección ciencia. p. 10

Ministerio del Ambiente, (2013). Políticas encaminadas a la Gestión del Cambio Climático en el Ecuador. Recuperado el 29 de Septiembre 2016 de <http://www.ambiente.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2013/09/Pol%C3%ADticas-encaminadas-a-la-Gesti%C3%B3n-del-Cambio-Clim%C3%A1tico-en-el-Ecuador.pdf>

Ministerio de Educación de España. (2011). Los glúcidos. Recuperado el 25 de enero de 2017 de <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/biomol/contenidos5.htm>

Nava, C. (2013). Temperatura óptima y etapa fenológica para determinar la termoestabilidad de la membrana celular en maíz y frijol. Recuperado el 1 de Diciembre de 2016 de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000200013

Nicholls, Clara., Altieri, Miguel. (2009). Cambio climático y agricultura campesina: impactos y respuestas adaptativas. LEISA. Recuperado el 11 de Septiembre de 2016 de <http://www.agriculturesnetwork.org/magazines/latin-america/4-respuestas-al-cambio-climatico/cambio-climatico-y-agricultura-campesina-impactos>

Ortiz, R. (2012). El cambio climático y la producción agrícola. Banco Interamericano de desarrollo.

Pastenes, C., Horton, P. (1996). Effect of High Temperature on Photosynthesis in Beans. Oxygen Evolution and Chlorophyll Fluorescence. *Plant Physiol.* 11 (2), 1245-1251.

- Peña, J., Grageda, O., Medina, T., Aguilar, J., Hernández, M., Solís, E., Aguado, G. (2004). Pérdidas de nitrógeno por emisión de N₂ y N₂O en diferentes sistemas de manejo y con tres fuentes nitrogenadas. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/pdf/302/30238606.pdf>
- Perdomo, C., Barbazán, M. (2008). NITRÓGENO. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Recuperado el 25 de octubre de 2016 de <http://www.fagro.edu.uy/fertilidad/publica/Tomo%20N.pdf>
- Porra, R. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Recuperado el 2 de Noviembre de 2016 de <https://pdfs.semanticscholar.org/7665/7d680421e22c37655f79386717fe93592b7d.pdf>
- Proaño, R. (2007). FITOQUIMICA Y AGROINDUSTRIALIZACIÓN DE DOS GENOTIPOS DE VASCONCELLEA, CHAMBURO (*Vasconcellea cundinamarcensis* V. Badillo) Y TORONCHE (*Vasconcellea stipulata* V. Badillo). Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Rani, B., Dhawan, K., Jain¹, V., Chhabra, M., Singh, D. (2013). High temperature induced changes in antioxidative enzymes in Brassica juncea (L) Czern&Coss. Recuperado el 12 de Noviembre de 2016 de http://www.australianoilseeds.com/__data/assets/pdf_file/0003/6861/46_High_temperature_induced_changes_in_antioxidative_enzymes_in_Brassica_juncea.pdf
- Ramírez, O. (22 de mayo de 2013). Producción agrícola en el Ecuador. *La Hora*. Sección país. p. 12

- Restrepo, H., Gómez, M., Garzón, A., Alzate, F., López, J., Rodríguez, A. (2013). Respuesta bioquímica de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) a diferentes condiciones de temperaturas nocturnas. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v7n2/v7n2a10.pdf>
- Rivero, R., Ruiz, M., Romero, L. (2004). Importance of N Source on Heat Stress Tolerance Due to the Accumulation of Proline and Quaternary Ammonium Compounds in Tomato Plants. *Plant Biol.* 6 (2004): 702-707
- Shim, I. S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. W., & Usui, K. (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022861312375>
- Tai, A., Val Martín, M., Heald, C. (2014). Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution. Recuperado el 17 de Septiembre de 2016 de <http://www.nature.com/nclimate/journal/v4/n9/full/nclimate2317.html>
- Tapia, C., Zambrano E., Monteros, A. (2008). Informe Nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. Recuperado el 28 de Septiembre de 2016 de <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Chile.pdf>
- The Agronomy guide, 2015-2016. Dwight D. Lingenfelter 2015. The Pennsylvania State University. .p30.
- Universidad de Puerto Rico de Mayagüez, (2010). PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: CONDUCTIVIDAD. Recuperado el 5 de noviembre de 2016 de <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p2-conductividad.pdf>
- Universidad de Sevilla, (2007). Mecanismo de defensa en plantas. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de https://rodas5.us.es/file/6dd7729c-aaaa-643c-5fd7-3606ff7fa6ca/1/estres_radiacion_apuntes_SCORM.zip/page_24.htm

- Vega, Antonio A, & Lemus, Roberto A. (2006). Modelado de la Cinética de Secado de la Papaya Chilena (*Vasconcellea pubescens*). Recuperado el 20 de Septiembre de 2016 de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071807642006000300005
- Vidal, Leslie V, Finot, Víctor L, Mora, Karina del C, & Venegas, Fernando A. (2009). Características Físico-Químicas del Látex de Papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). Recuperado el 14 de Septiembre de 2016 de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642009000600012
- Wang, D., Heckathorn, A., Mainali, K, Hamilton, E. (2008). Effects of N on plant response to heat-wave: a field study with prairie vegetation. Recuperado el 24 de Septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017129>
- Wang, K., Zhang, X., Goatley, M., Ervin E. (2014). Heat Shock Proteins in Relation to Heat Stress Tolerance of Creeping Bentgrass at Different N Levels. Recuperado el 20 de Septiembre de 2016 de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102914>
- Waraich, E., Ahmand, R., Halim, A., Aziz, T. (2012). Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants. Recuperado el 11 de Diciembre de 2016 de <http://www.scielo.cl/pdf/jsspn/v12n2/art03.pdf>

ANEXOS

	Df	Sum Sq	Mean Sq	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	5	16,84	3,368	4,447	0,00266 **
Residuales	39	29,54	0,757		
Códigos: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' 0.1 ' ' 1					

Anexo 1: ANOVA para análisis estadístico de la concentración real de clorofila *a*

Tratamiento	Media	Grupos
Agua 45°C	4,7641	a
Sulfato de amonio 45°C	4,3001	ab
Agua 33,5°C	4,1571	ab
Sulfato de amonio 33,5°C	3,2841	b
Agua 25°C	3,2752	b
Sulfato de amonio 25°C	3,1634	b

Anexo 2: Prueba de Duncan para análisis estadístico de la concentración real de clorofila *a*. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.01$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	5	0,02866	0,005733	2,556	0,0425*
Residuales	40	0,08973	0,002243		
Códigos: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' 0.1 ' ' 1					

Anexo 3: ANOVA para análisis estadístico de la concentración real de clorofila *b*

Tratamiento	Media	Grupos
Agua 45°C	1,5787	a
Sulfato de amonio 45°C	1,5051	ab
Agua 33,5°C	1,4883	ab
Sulfato de amonio 33,5°C	1,2842	bc
Agua 25°C	1,2478	c
Sulfato de amonio 25°C	1,2030	c

Anexo 4: Prueba de Duncan para análisis estadístico de la concentración real de clorofila *b*. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.1$

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	5	209,51	41,90	7,997	0,000404 ***

Tiempo	2	147,34	73,67	14,060	0,000210 ***
Trat:Tiempo	10	11,14	1,11	0,213	0,991849
Residuales	18	94,31	5,24		
Códigos: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 .' 0.1 ' ' 1					

Anexo 5: ANOVA para análisis estadístico del porcentaje de pérdida de electrolitos

Tratamiento	Media	Grupos
Agua 45°C	11,27	a
Sulfato de amonio 45°C	9,283	ab
Agua 33,5°C	6,952	ab
Agua 25 °C	6,154	bc
Sulfato de amonio 33,5 °C	5,345	bc
Sulfato de amonio 25 °C	4,133	c

Anexo 6: Prueba de Duncan para análisis estadístico del porcentaje de pérdida de electrolitos. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.1$

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	5	1,114	0,22272	5,605	0,000161 ***
Residuales	86	3,417	0,03974		
Códigos: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 .' 0.1 ' ' 1					

Anexo 7: ANOVA para análisis estadístico de la actividad catalasa

Tratamiento	Media	Grupos
Agua 25°C	10,7856	a
Sulfato de amonio 33,5 °C	7,1161	ab
Sulfato de amonio 25°C	6,7263	ab
Sulfato de amonio 45°C	6,1454	b
Agua 33,5 °C	5,2491	b
Agua 45 °C	3,3426	b

Anexo 8: Prueba de Duncan para análisis estadístico de la actividad catalasa. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p = 0.1$

