



**EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y  
MOLECULARES DE *Ochroma  
pyramidale* (BALSA)  
SOMETIDAS A ESTRÉS HIDRICO**

PETER ROBERT VERA MALDONADO  
HAYRON CANCHIGNIA MARTINEZ



**EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y  
MOLECULARES DE Ochroma  
pyramidale (BALSA)  
SOMETIDAS A ESTRÉS HIDRICO**

**PETER ROBERT VERA MALDONADO  
HAYRON CANCHIGNIA MARTINEZ**

**EFECTOS FISIOLÓGICOS Y  
MOLECULARES DE Ochroma  
pyramidale (BALSA)  
SOMETIDAS A ESTRÉS HIDRICO**

Título original: EFECTOS FISIOLÓGICOS Y  
MOLECULARES DE Ochroma  
pyramidale (BALSA)  
SOMETIDAS A ESTRÉS HIDRICO

© PETER ROBERT VERA MALDONADO  
HAYRON CANCHIGNIA MARTINEZ

2020,  
Publicado por acuerdo con los autores.  
© 2020, Editorial Grupo Compás  
Universidad Técnica Estatal de Quevedo  
Guayaquil-Ecuador

Grupo Compás apoya la protección del copyright, cada uno de sus textos han sido sometido a un proceso de evaluación por pares externos con base en la normativa del editorial.

El copyright estimula la creatividad, defiende la diversidad en el ámbito de las ideas y el conocimiento, promueve la libre expresión y favorece una cultura viva. Quedan rigurosamente prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o almacenamiento total o parcial de la presente publicación, incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico, como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia, sin la autorización de los titulares del copyright.

Editado en Guayaquil - Ecuador

ISBN: 978-9942-33-309-4

Cita.

Vera. P. Canchignia. H. (2020) EFECTOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE *Ochroma pyramidale* (BALSA) SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO, Editorial Compás, Guayaquil Ecuador, 58 pag

## Contenido

PORTADA .....	1
Índice de tablas.....	5
Índice de ilustraciones .....	6
Prólogo.....	8
Introducción.....	9
CAPÍTULO I: marco contextual de la investigación.....	3
Contextualización y ubicación de la problemática .....	3
Situación actual de la problemática .....	4
CAPÍTULO II: Marco teórico de la investigación .....	10
Ochroma pyramidale.....	10
Estrés hídrico .....	10
Estomas.....	11
Evapotranspiración.....	11
Plantaciones forestales.....	12
PCR .....	12
Tolerancia a la sequia .....	13
Estrés hídrico en plantas.....	14
Influencia del endurecimiento por estrés hídrico. ....	15
Resistencia genética a estrés hídrico. ....	15
Comportamiento estomático de dos genotipos cultivados bajo estrés hídrico .....	16
Impacto del cambio climático en el desarrollo y requerimientos hídricos de los cultivos .....	17
Efecto del estrés hídrico sobre el rendimiento y evapotranspiración del girasol .....	18

Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico ...	18
Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos. una visión actualizada .....	19
Red de coexpresión de 320 genes de <i>Tectona grandis</i> relacionados con procesos de estrés abiótico y xilogénesis .....	19
Análisis de la expresión transcripcional inducida bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en <i>Capsicum chinense</i> BG-3821 .....	20
CAPÍTULO III: Desarrollo de la investigación .....	22
Observación científica .....	22
Procesamiento y análisis de la información.....	22
Ficha de laboratorio .....	22
Número de hojas.....	22
Número de brotes.....	23
Estado del estoma .....	23
Elongación del tallo .....	24
Densidad estomática .....	24
Extracción de ADN .....	25
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de perfiles genéticos asociados a la tolerancia a sequias .....	27
Electroforesis de ADN. ....	27
ERIC-PCR perfiles de huellas dactilares .....	28
Reactivos para PCR-RAPD .....	28
Programa de PCR .....	29
Árbol filogenético .....	29
Diseño de la Investigación .....	30
Diseño para los datos morfológicos y adaptativos en plantas.....	30

Diseño para los datos morfofisiológicos de las estomas .....	30
CAPÍTULO IV: Resultados de la investigación .....	31
Evaluación de respuesta morfo fisiológica de <i>O. pyramidale</i> sometida a estrés hídrico .....	31
Analizar las distorsiones morfológicas estomáticas de <i>O. pyramidale</i> ocasionado por la pérdida de agua. ....	36
Generar perfiles genéticos asociados a estrés hídrico <i>O. pyramidale</i> .	40
Discusión .....	45
Examinar la respuesta morfo fisiológica de <i>O. pyramidale</i> con ausencia de agua .....	45
Identificar genes relacionados a la tolerancia del estrés hídrico empleando técnicas moleculares .....	46
CAPÍTULO V: Conclusiones .....	48
Referencias bibliográficas .....	49

## Índice de tablas

Tabla 1: Estado estomático .....	23
Tabla 2: Valores cualitativos del estado de la planta .....	24
Tabla 3: Parejas de Primers .....	27
Tabla 4: Componentes de la PCR .....	28
Tabla 5: Programa de PCR-RAPD .....	29
Tabla 6: Esquema del Análisis de Varianza de datos morfológicos y adaptativos en plantas.....	30
Tabla 7: Esquema del Análisis de Varianza de datos morfofisiológicos de las estomas .....	30

## Índice de ilustraciones

Ilustración 1: Número de hojas en plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	31
Ilustración 2: Número de brotes en plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	32
Ilustración 3: Número de estomas en plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	33
Ilustración 4: Estado de plantas de <i>O. pyramidale</i> bajo déficit hídrico. ..	34
Ilustración 5: Elegancia del tallo de plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	35
Ilustración 6: Diámetro del Tallo de plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	36
Ilustración 7: Longitud de estomas de hojas de plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	37
Ilustración 8: Diámetro de estomas de hojas de plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	38
Ilustración 9: Estado de estomas de hojas de plantas de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico. ....	39
Ilustración 10: Fotografías del estado estomático, A. Estomas semiabierto 15 días, B. Estomas cerrados y semi-abiertos 30 días, C. Estomas cerrados 45 días, D Estomas cerrados 60 días .....	40
Ilustración 11: Identificación de ADN genómico de <i>O. pyramidale</i> . A, marcador de peso molecular (M). B, perfil de amplificación de la 8 muestra de plantas sometidas a estrés hídrico, 15 días (1-2), 30 días (3-4), 45 días (5-6) y 60 días (7-8), marcadores de peso molecu .....	41
Ilustración 12: Identificación molecular mediante ERIC-PCR al ADN genómico de <i>O. pyramidale</i> . A, marcador de peso molecular (M). B, perfil de amplificación de la 8 muestra de plantas sometidas a estrés hídrico, pozo 1 y 2 a 15 días, pozo 3 y 4 a 30 días, pozo 5 y 6 a 4.....	42
Ilustración 13: Agrupamiento filogenético de las muestras de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico mediante ERIC-PCR.....	43

Ilustración 14: Identificación molecular mediante RAPDs al ADN genómico de <i>O. pyramidale</i> , A, marcador de peso molecular. B, perfil de amplificación de la 8 muestra de plantas sometidas a estrés hídrico, 15 días (1-2), 30 días (3-4), 45 días (5-6) y 60 días (7-8), marc .....	44
Ilustración 15: Agrupamiento filogenético de las muestras de <i>O. pyramidale</i> sometidas a déficit hídrico mediante RAPDs.....	45

## Prólogo

Este libro se enfocó principalmente en enfatizar las respuestas genéticas y fisiológicas de *Ochroma pyramidale* ante la inducción de un déficit hídrico, un factor importante en la baja producción y alta mortalidad de plantas en campo. Los ensayos fueron ejecutados en el invernadero del laboratorio de microbiología y biología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Correspondiente a los ensayos fueron evaluadas las variables de elongación del tallo, diámetro del tallo, número de brotes, número de hojas, número de estomas, longitud de estomas y diámetro de estomas por 75 días.

Se emplearon técnicas de biología molecular ERIC-PCR y RAPD para la identificación de los cambios que ocurren en los perfiles genéticos de plantas bajo déficit hídrico. Las plantas sometidas al déficit hídrico presentaron alteraciones morfológicas a partir de los 45 días, este contraste se logra apreciar mejor a los 75 días, como es el caso de los promedios de las variables: elongación del tallo con 12,18 cm, diámetro del tallo con 1,69 cm, número de brotes con 0,95 y número de hojas con 3,4. Por otra parte, la evaluación realizada a las hojas en la densidad estomáticas y longitud de las mismas dieron como resultado que, en el número de estomas ambos tratamientos fueron estadísticamente iguales durante el tiempo de evaluación, correspondiente a la longitud y diámetro de estomas, el tratamiento sin presencia de riego o con déficit hídrico presentó los más bajos promedios con 23,58  $\mu\text{m}$  para la longitud y 16,80  $\mu\text{m}$  para el diámetro a los 60 días de la evaluación, estadísticamente inferiores en comparación a los tratamientos con presencia de riego.

## Introducción

La elección de especies con capacidad de adaptación a recursos limitados es un criterio fundamental desde el enfoque de la sustentabilidad. El incremento de urbanizaciones en zonas áridas ha impulsado el desarrollo de programas de forestación urbana que buscan emplear especies con bajos requerimientos hídricos para lograr la sustentabilidad del bosque urbano ya que el recurso natural más limitante es el agua (Martínez *et al.* 2013).

La sequía es uno de los factores ambientales limitativos en terrenos forestales deteriorados. La disponibilidad de agua puede alterar en gran medida el área foliar, la tasa de fotosíntesis, el patrón de distribución de biomasa y, por consecuencia, la productividad de la planta. El marchitamiento de las hojas y de los tallos jóvenes es otro efecto causado por la sequía, que durante periodos prolongados puede provocar la muerte de la planta o el daño permanente de alguna de sus partes (Martínez *et al.* 2002).

El déficit hídrico es uno de los principales factores ambientales que afecta el desarrollo de las plantas, este se pone de manifiesto de varias maneras, uno de los principales aspectos es la reducción del crecimiento. En las plantas las condiciones de baja humedad en el suelo han tenido una influencia negativa en el crecimiento y desarrollo de las mismas, viéndose afectado el crecimiento y la productividad. Otros autores han señalado las afectaciones de un período de déficit hídrico en parámetros del intercambio gaseoso en las hojas, así como la incidencia en la abscisión foliar (Díaz *et al.* 2014).

El estrés hídrico afecta la síntesis de proteínas, la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de ácidos nucleicos, que pueden resultar en una reducción del rendimiento. Además de la variación genotípica, el efecto de la sequía en una planta depende del momento, la duración y la severidad

del estrés. Sin embargo, la precipitación limitada durante la temporada de crecimiento limita el rendimiento (Turhan y Baser 2004).

Para incrementar la productividad vegetal se investiga el desarrollo de plantas mejoradas genéticamente, con mayor tolerancia al estrés hídrico; para ello es necesario seleccionar genes de especies con una historia evolutiva de alta tolerancia a factores abióticos adversos como es el caso de «olluco». *Ullucus tuberosus* es una Basellaceae andina, que al igual que Cactaceae, Chenopodiaceae y Aizoaceae pertenece a los Caryophyllales, orden que incluye a especies productoras de compuestos que, le confieren a la planta la tolerancia al estrés hídrico (Romero y Estrada 2005).

*Ochroma pyramidale*, también llamada balsa, es una especie forestal que posee gran demanda en el mercado internacional. Se cultiva de manera natural y para reforestación, especialmente en la selva subtropical de Ecuador, donde es uno de los recursos forestales y maderables de mayor aprovechamiento; por tal razón es uno de los rubros económicos de importancia en la economía de nuestro país. En el comercio internacional se conoce por su nombre común de balsa Ecuatoriana (González *et al.* 2010).

El presente trabajo contiene cinco capítulos: Marco Conceptual; Marco Teórico; Metodología; Resultados y Discusión; Conclusiones y Recomendaciones los cuales tienen como finalidad analizar los efectos fisiológicos y moleculares de plantas de balsa sometidas a estrés hídrico en ambientes controlados.

# **CAPÍTULO I: marco contextual de la investigación**

## **Contextualización y ubicación de la problemática**

La investigación se desarrolló en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio de Microbiología, situado en la ciudad de Quevedo provincia de Los Ríos, cuenta con una población de 150.827 habitantes, su actividad económica principal es la agropecuaria. Es la cabecera cantonal del cantón Quevedo y la ciudad más grande y poblada de la provincia de Los Ríos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos 2010).

Quevedo se encuentra situado en el corazón del Litoral, por su posición geográfica y vial privilegiada ha beneficiado al país, además permite un intenso tráfico terrestre y fluvial. Posee un clima que beneficia para el cultivo. Es una población situada en las orillas del río Quevedo en el sector denominado "Las lomas". Se encuentra ubicada al 1° 20' 30" de Latitud Sur y los 79° 28' 30" de Longitud occidental, dentro de una zona subtropical (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos 2010).

La habilitación de tierras para actividades agropecuarias a expensas de los bosques naturales tiene efectos ambientales directos e indirectos. El aumento en la penetración de los rayos solares incide en forma directa en la evapotranspiración del suelo, se produce un aumento de la salinidad y pérdida de la materia orgánica, de los nutrientes y de la biomasa de las capas superficiales del suelo, alterando sus propiedades físicas y químicas. El desmonte facilita también los procesos erosivos del suelo restando productividad.

El cambio climático continuará su avance y se debe estar preparado para adaptarse a este y ser resiliente, a nivel Mesoamericano la producción de agua es vulnerable al reducirse la precipitación a futuro, afectando el acceso a servicios hidrológicos de los ecosistemas por

impacto del cambio climático. Esto como resultado de probables alteraciones de las condiciones hidrológicas del lugar. A nivel global el 70% del agua dulce (2.5%) extraída es utilizada en el sector agrícola, 20% y 10% para uso industrial y doméstico, respectivamente. Las plantas presentan gran sensibilidad al déficit hídrico ante escenarios de cambio climático, tanto en cultivo regados y sin riego.

### **Situación actual de la problemática**

Durante la fase de establecimiento en campo las plántulas forestales pueden experimentar periodos de estrés hídrico como resultado de su limitada capacidad de absorber agua, fenómeno que incluso puede ocurrir con el suelo bien hidratado. Ello puede ser debido a las bajas temperaturas del suelo durante el periodo invernal, que aumentan la rigidez de las membranas celulares y la viscosidad del agua. La baja producción y adaptación de las especies forestales se debe a factores medio ambientales como las bajas precipitaciones que afecta el desarrollo de las plantas, esto se conoce como déficit hídrico un problema mundial que afecta a los grandes y pequeños productores.

En la actualidad, Ecuador posee, más de 20 mil hectáreas de plantaciones entre bosques naturales y reforestados. Siendo las zonas de mayor producción las provincias del Guayas, El Oro, Los Ríos y Pichincha. La balsa requiere de un clima cálido y húmedo. La cantidad mínima de precipitación que tolera es de alrededor de 1500 mm anuales lo que representa un gran problema en la estación seca, donde las precipitaciones son escasas lo que culmina con una alta mortalidad.

Más del 50 % de la producción de balsa en establecimiento es afectada por la falta de agua. Las plantas sometidas a estrés son más susceptibles al ataque de patógenos y plagas debido a las bajas expresiones de los mecanismos de resistencia.

El desarrollo de cultivos de especies nativas requiere de conocimientos y tecnología que permitan su establecimiento a escalas compatibles con un aprovechamiento comercial. Entre otros, es necesario generar información acerca de técnicas potenciales de implantación, así como de los mecanismos de resistencia y respuesta a condiciones naturales de estrés hídrico al que las especies estarían sometidas en estas nuevas áreas y la variación climatológica existente entre las distintas especies y poblaciones.

El desarrollo de estrategias adaptativas durante las etapas tempranas de la ontogenia parecería así determinante para su supervivencia en ambientes con distintos tipos de estrés. El crecimiento y desarrollo de las plantas son controlados por reguladores internos que son modificados acorde a las condiciones ambientales, siendo la disponibilidad de agua (mediada por las precipitaciones), la temperatura, y la luz tres de los principales factores. El mantenimiento de la competitividad de un sistema productivo depende no sólo de la sobrevivencia de las especies sino también de que sus tasas de crecimiento sean compatibles con la actividad que se plantea.

De esta forma no sólo es importante la identificación de los valores umbrales (máximos y mínimos) de aquellos factores que afecten las tasas de sobrevivencia de las especies, sino también la determinación de rangos óptimos de producción de las variables ambientales relacionadas con el factor de estrés.

## **CAPÍTULO II: Marco teórico de la investigación**

### ***Ochroma pyramidale***

Árbol grande, de copa tipo caliciforme. El fuste es liso y puede presentar gambas. La corteza es lisa, gris, pálida y con cicatrices lineales, pero internamente fibrosa. Presenta un follaje perennifolio, sus hojas son simples y alternas, acorazonadas, de 20 a 40 cm de largo, borde liso y con pelos epidérmicos rojizos. Es una especie hermafrodita, las flores son aromáticas, vistosas, de cinco pétalos, blancas pubescentes y con el cáliz color verde, son polinizadas por insectos nocturnos. Produce frutos secos, tipo cápsula dehiscente, largos y en forma de bastón; son semileñosos y cilíndricos de 14 a 24 cm de largo recubiertos de lana. De su parecido a patas de liebres o conejos se deriva su nombre científico. Las semillas son abundantes en forma de pequeña gota, ovoides, de 3 a 5 mm de largo, color castaño oscuro y se encuentran envueltas en lana amarillenta y sedosa (Rojas & Torres, 2009).

Sus principales usos son: Aislamiento térmico. Flotadores. Tablero sándwich. Maquetas. Modelos reducidos. Cajones de embalaje livianos. Artículos atléticos y deportivos. Cinturones y botes salvavidas. Boyas para madera. Juguetes. Construcción de balsas por óptima flotabilidad. Casas flotantes. Artesanía. Flotadores de redes y anzuelos sonda. La Topa es moderadamente resistente al ataque biológico, por lo que se recomienda para usos no estructurales (Oshiro, 2014).

### ***Estrés hídrico***

La sequía, escasez de agua disponible o estrés por déficit hídrico en el medio es uno de los principales inconvenientes a los que pueden tener que enfrentarse los seres vivos. Conocer el efecto fisiológico que la sequía produce en la planta es esencial para un buen desarrollo del cultivo. En climas áridos o semiáridos la falta de agua es el principal factor limitante

del crecimiento tanto en plantas C3 como C4. La cantidad de agua que contiene la planta es el resultado del balance interno entre el agua absorbida por las raíces y el agua que se pierde por transpiración. La mayor parte del agua absorbida es transportada a las hojas y se pierde por transpiración, tan sólo entre un 1-3% pasa al metabolismo de las plantas. El estrés hídrico afecta a la mayor parte de las funciones vitales de la planta, de modo que prácticamente no hay ningún proceso fisiológico que no esté afectado por el mismo (Montoya, 2010).

### **Estomas**

Las estomas son grupos de dos o más células epidérmicas especializadas cuya función es regular el intercambio gaseoso y la transpiración las partes verdes aéreas de la planta, particularmente en las hojas, donde pueden hallarse en una o ambas epidermis, más frecuentemente en la inferior. Su número oscila entre 22 y 2.230 por mm<sup>2</sup>. Las raíces no presentan estomas. Las plantas parásitas sin clorofila como *Monotropa* y *Neottia* no tienen estomas (*Orobanche* los tiene en tallo). Las partes aéreas sin clorofila (hojas variegadas) pueden tener estomas pero no son funcionales, igual que los de los pétalos (Gonzales, 2013).

### **Evapotranspiración**

Cuando se cuantifica el ciclo hidrológico de una cuenca o de un agroecosistema, la principal entrada de agua está representada por la precipitación y como salidas están la evapotranspiración, la escorrentía y la percolación. La evapotranspiración es la suma de la evaporación desde la superficie del suelo y del agua interceptada por la vegetación, y de la transpiración desde las plantas, especialmente por las estomas; su conocimiento es útil para determinar las necesidades de agua de un cultivo o de una región. Las tasas de evapotranspiración están controladas por la radiación solar, la temperatura, el déficit de presión de

vapor, el intercambio de humedad del aire entre la superficie y la atmósfera, el tipo de cobertura vegetal, las propiedades físicas y químicas del suelo, la sanidad del cultivo y, por las prácticas que alteran el microclima como son la cobertura vegetal, el sombrero, el riego, las barreras rompevientos y las distancias de siembra (Jaramillo, 2006).

### ***Plantaciones forestales***

Las plantaciones forestales representan una alternativa económica y de beneficio social, ya que cumplen una función en bien de la protección del ambiente, al disminuir la presión existente sobre el bosque natural. Adicionalmente, estas contribuyen significativamente en el funcionamiento de los procesos ecológicos, paisajísticos, de protección de suelos (control de erosión y ciclaje de nutrientes), agua y acumulación de carbono. Algunas experiencias demuestran que las plantaciones con especies nativas tienen un buen potencial para acelerar los procesos de recuperación de la biodiversidad en áreas degradadas. Las plantaciones mixtas, en comparación con las plantaciones puras, promueven la regeneración de una mayor diversidad de especies en el sotobosque, al crear una mayor variabilidad en el hábitat y un microclima que favorece a los dispersores y a la adaptabilidad de especies para la germinación y crecimiento (Alice, Montagnini, & Montero, 2004).

### ***PCR***

Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis<sup>1</sup> y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento. Actualmente sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa

catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

## ADN

El ADN es clásicamente definido como un polinucleótido constituido por cadenas antiparalelas 125 de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente, dispuestos de forma complementaria y adoptando una estructura enrollada de doble hélice dextrógira. Conviene, inmediatamente, distinguir la existencia en el ser humano de dos tipos de ADN: el ADN nuclear y el ADN mitocondrial. Ambos, pese a que su estructura bioquímica es similar, tienen características totalmente diferentes, de las que algunas tienen especial relevancia en el campo de la paleopatología (Lorente, 2016).

### ***Tolerancia a la sequía***

Las plantas responden al estrés hídrico desarrollando adaptaciones evolutivas tanto a nivel morfológico, anatómico y celular, que les permiten vivir en condiciones de constante estrés hídrico. Ellas también poseen mecanismos de aclimatación que se activan en respuesta a estrés hídrico. Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, se dan cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento. La limitación de la expansión foliar es uno de los procesos más afectados en estas condiciones, pues de ella depende la fotosíntesis. Otro proceso que se modifica es el crecimiento radicular. Se plantea que este es uno de los sitios primarios de percepción del daño. Las raíces son un órgano clave para la adaptación a la sequía. En muchas circunstancias la sensibilidad de las raíces al estrés limita la productividad de las plantas (Florigo & Bao, 2002).

### *Propagación in vitro*

Una de las prácticas más adecuadas para salvaguardar las especies vegetales es a través de la germinación asimbiótica in vitro, obteniendo miles de plantas, con una variabilidad genética mucho mayor que la obtenida por la propagación clonal, lo cual es deseable en caso de una reintroducción a sus áreas naturales. Las sales basales utilizadas tradicionalmente en los medios de cultivo para la germinación y desarrollo in vitro de otras (Suarez, Jarma, & Avila, 2006).

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales in vitro, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva & Pérez, 2015).

### ***Estrés hídrico en plantas.***

Se analizó el efecto de diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico en características relacionadas con la resistencia a estrés hídrico en plántulas de *Pinus halepensis*. Los caracteres examinados fueron el grado de ajuste osmótico y variación de la elasticidad de las paredes celulares, la transpiración cuticular y el potencial de formación de raíces. Los tratamientos de estrés hídrico fueron aplicados a base de someter a las plantas a ciclos de sequía, desde valores en saturación hasta unos niveles de desecación definidos por los potenciales hídrico base de las plantas (Villar et al., 2013).

Los niveles o tratamientos de desecación fueron un testigo, que corresponde al nivel de riego aplicado en el Centro de Mejora Forestal durante la fase de endurecimiento, caracterizado por un potencial

hídrico base medio de -0,78 MPa, un nivel A bajo de estrés hídrico bajo (-1,2MPa), un nivel B de estrés moderado (-1,8 MPa) y un nivel C de estrés fuerte (-2,2 MPa) Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos en el potencial osmótico en saturación ni en el módulo de elasticidad, 10 que indica que ninguno de los tratamiento fue capaz de inducir de ajustes osmóticos ni modificaciones en la elasticidad de las paredes (Villar et al., 2013).

### ***Influencia del endurecimiento por estrés hídrico.***

El incremento de la fertilización nitrogenada produce plantas más grandes, con mayor concentración de N radical ([NR]) y contenido total de N en la planta (N Total). El endurecimiento causó la reducción del tamaño de las plantas, pero aumentó tanto la concentración de N en tallos ([NA]) y raíz como N Total. No obstante, el efecto del endurecimiento sobre estas variables presentó una interacción con la fertilización, de tal modo que el incremento de N en los tejidos sólo se observó en plantas altamente fertilizadas, pero no en las pobremente fertilizadas (Villar, Peñuelas, & Carrasco, 2000).

El potencial osmótico en saturación ( $\Psi_{\pi 100}$ ), la conductancia estomática ( $G_s$ ), la transpiración residual (TR) y la capacidad de regeneración radical (CRR) de las plantas no fue afectada significativamente por la fertilización. En cambio, el endurecimiento si redujo  $G_s$ , TR y CRR, no induciendo cambios de  $\Psi_{\pi 100}$ . En campo, la mortandad fue muy baja no observándose diferencias significativas entre tratamientos. El crecimiento, especialmente en diámetro, fue positivamente afectado por la fertilización de vivero, pero negativamente por el endurecimiento (Villar, Peñuelas, & Carrasco, 2000).

### ***Resistencia genética a estrés hídrico.***

En el año agrícola 2010-2011 bajo invernadero, se evaluaron 21 variedades de papa en diseño experimental completamente aleatorio

en arreglo de parcelas divididas con el objetivo de identificar fuentes y mecanismos de resistencia genética a sequía. Se aplicaron dos tratamientos de sequía (seis y dieciocho días sin riego) y se evaluaron parámetros fisiológicos, morfológicos, mecanismos integrados de resistencia y componentes de rendimiento (Gabriel et al., 2011).

Los resultados mostraron a Robusta como la más resistente y a Runa Toralapa como la que mejor recuperó después de la sequía entre las variedades mejoradas. Los mecanismos asociados con la resistencia en estas variedades fueron el grado de recuperación, el grado de postrado, la materia seca del follaje y el volumen de tubérculos. Por lo que las variedades más resistentes recuperaron mejor y tuvieron mayor volumen de tubérculos y menores grado de postrado y materia seca de follaje. Entre las nativas, Runtu papa (stn) y Luki (juz) fueron el más resistentes y las que mejor recuperaron y los mecanismos asociados con la resistencia fueron recuperación, grado de postrado, volumen de tubérculos y el uso eficiente del agua (Gabriel et al., 2011).

### ***Comportamiento estomático de dos genotipos cultivados bajo estrés hídrico***

El presente trabajo evaluó la influencia del estrés hídrico sobre la transpiración ( $E$ ), resistencia difusiva ( $R_s$ ), temperatura foliar ( $T_f$ ) y tensión de agua en el xilema ( $\psi_w$ ) de plantas jóvenes de pitanga. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, con cuatro repeticiones y un esquema factorial  $2 \times 2$ , correspondiente a dos accesos (IPA 2.2 y IPA 4.3) y dos tratamientos hídricos (control y bajo estrés). El análisis de la varianza reveló un efecto significativo con un 5 % de probabilidad para los accesos y tratamientos hídricos, así como sus interacciones, excepto para la  $T_f$ . Entre los genotipos estudiados se observó variabilidad genética respecto al comportamiento estomático y tensión de agua en el xilema. Los accesos IPA 2.2 e IPA 4.3 son tolerantes a períodos de estrés hídrico,

recuperándose más rápidamente el IPA 4.3 del estrés severo que el IPA 2.2 (Nogueira et al., 200AD).

### ***Impacto del cambio climático en el desarrollo y requerimientos hídricos de los cultivos***

Debido al impacto del cambio climático la modificación de los componentes del ciclo hidrológico, principalmente la evapotranspiración y la precipitación, tendrá un efecto radical en las demandas de riego y en la gestión de los sistemas de riego. Las proyecciones del cambio climático indican un incremento de la temperatura ambiental, con variabilidad en el espacio y en el tiempo. En este trabajo se analizó el impacto esperado del cambio climático en las demandas hídricas y en el desarrollo de los cultivos usando proyecciones de cambio climático para el escenario de emisiones medio moderado (A1B), para las condiciones del Distrito de Riego 075, Río Fuerte, Sinaloa, México. Se estimó que para finales de siglo el aumento anual de la evapotranspiración de referencia será 10 % respecto a los valores actuales. La demanda hídrica de los cultivos se reducirá 13 % para el ciclo otoño–invierno, 6 % para el ciclo primavera–verano e incrementará 7 % en el ciclo de perennes para fines de siglo (Ojeda et al., 2011).

Lo anterior se atribuye a que a pesar de que la evapotranspiración de referencia se incrementará, el mayor impacto por incremento de la temperatura será en la reducción del ciclo fenológico de los cultivos anuales. Por tanto, es necesario implantar acciones de adaptación: en primer lugar, el uso de híbridos o variedades de ciclo más largo que las actuales, con resistencia al estrés térmico y, en segundo lugar, la compactación del periodo de siembra hacia los meses más fríos (Ojeda et al., 2011).

## ***Efecto del estrés hídrico sobre el rendimiento y evapotranspiración del girasol***

La experimentación de campo se llevó a cabo en Rimski Šančevi, Instituto de Cultivos de Campo y Vegetales en Novi Sad, entre 2000 y 2005. El suelo era calcáreo en una terraza de loess. Utilizando el rendimiento (KY) como factor de medición, el estudio intentó cuantificar los efectos del déficit de agua de la fracción fácilmente disponible en el suelo sobre el rendimiento y la evapotranspiración a lo largo del ciclo. irrigado ( $T_1$ ), para el cual se activó el riego cuando la humedad del suelo disminuyó a 60-65% de la capacidad de campo y el control no irrigado ( $T_0$ ). El híbrido de girasol utilizado en el estudio fue NS-H-111 (Pejić et al., 2009).

En promedio, no hubo diferencias significativas en el rendimiento entre los tratamientos  $T_1$  ( $3.79 \text{ t ha}^{-1}$ ) y  $T_0$  ( $3.75 \text{ t ha}^{-1}$ ). La evapotranspiración estacional (ETm) medida para el tratamiento con  $T_1$  estuvo en el rango de 402 a 479 mm. El factor de respuesta de rendimiento (KY) fue 0.20 para el ciclo completo y 0.27, 0.31 y 0.48 para el período vegetativo, la floración y el desarrollo del rendimiento, respectivamente. La etapa entre la floración y la madurez fue la más sensible a la insuficiencia de agua (Pejić et al., 2009).

## ***Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico***

El estrés abiótico es una de las principales causas de las pérdidas de las producciones agrícolas a nivel mundial. Los reguladores del crecimiento vegetal tales como el ácido abscísico, el etileno, el ácido jasmónico y el ácido salicílico son esenciales en la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Se describen las generalidades de estas moléculas así como su función en la respuesta de la planta frente al estrés abiótico (Suárez, Álvarez, & Ramírez, 2012).

## **Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos. una visión actualizada**

A partir de la revisión bibliográfica publicada en esta revista en el 2001 y la publicada por la Journal of Plant Growth Regulation en el 2003, en este trabajo se hace una actualización sobre este tema, analizando y discutiendo la información que existe, a nivel internacional, acerca de los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos, como son el estrés térmico, hídrico, salino y por metales pesados. Se presentan, además, los avances que en este tema se han obtenido en Cuba, tanto con la aplicación de 24-epibrasinólida como con la de algunos análogos espirostánicos; así como la respuesta ante el estrés de altas temperaturas de algunos genotipos de tomate con diferentes niveles endógenos de castasterona (Núñez *et al.*, 2010).

## **Red de coexpresión de 320 genes de *Tectona grandis* relacionados con procesos de estrés abiótico y xilogénesis**

*Tectona grandis* es un árbol maderable de importancia económica en bosques tropicales y subtropicales. Mediante este estudio, se identificaron familias de factores de transcripción (FTs) y genes codificantes para enzima, diferencialmente expresados en el xilema del tallo, implicados en la regulación de la respuesta a estrés abiótico y xilogénesis en *T. grandis*. Así, fue analizada la distribución evolutiva de 19 genes codificantes para FTs *T. grandis* mediante análisis filogenéticos. También, fue utilizada la minería de bases de datos y publicaciones para identificar 320 genes de *Arabidopsis thaliana* (ortólogos a *T. grandis*) como soporte experimental y predictivo (Camel, Galeano, & Carrer, 2017).

Como resultados, se encontraron FTs de las familias *bZIP*, *MYB*, *NAC*, *ER*, *bHLH*, *NuY* y genes que codifican enzimas. Así mismo, se logró analizar el interactoma de *T. grandis* encontrando correlaciones de Pearson significativas para genes que regulan vías metabólicas de

fenilpropanoides y estrés abiótico. Además, la red de coexpresión reveló nodos y aristas entre los genes *TgRAP1*, *TgMyB1*, *TgHSF1*, *TgMyB3*, *TgNAC1*, *TgTsiid1*, *TgLieTFs1*, *TgNuy3*, *TgRAP2* y *TgNuy4*. En particular, los análisis de ontología génica mostraron 31 genes de respuesta a estrés abiótico, principalmente *TgHShT1*, *TgHSF1* y *TgHSF2* como correguladores. Además, se encontró que el regulador maestro *TgNAC1*, está involucrado en la corregulación de otros factores de transcripción (Camel, Galeano, & Carrer, 2017).

### **Análisis de la expresión transcripcional inducida bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en *Capsicum chinense* BG-3821**

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión transcripcional inducida bajo diferentes tipos de estrés biótico y abiótico en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* BG-3821). Los estudios de expresión de genes de plantas bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico son importantes porque son una estrategia para entender, a nivel molecular, cómo las plantas actúan en fenómenos de resistencia a patógenos y condiciones abióticas de crecimiento, lo que puede ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de defensa a estos tipos de estrés en las plantas (Barrera et al., 2008).

Para el análisis transcripcional se emplearon sondas moleculares de los EST R50 y R100. Ambos son fragmentos diferenciales y posiblemente implicados en la respuesta de resistencia de *C. chinense* BG-3821 a infecciones por el virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV). Se comprobó la especificidad de la expresión de los genes correspondientes a R50 y R100 en plantas de *C. chinense* infectadas con PHYVV, así como por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y el hongo *Fusarium solani*. Plantas infectadas con el oomiceto *Phytophthora capsici* no indujeron la expresión de estos genes (Barrera et al., 2008).

Asimismo, se evaluó si la expresión de estos genes es inducida mediante la aplicación de ácido salicílico (AS), metil Jasmonato, etileno o estrés abiótico (hídrico y térmico) a plantas de *C. chinense* BG-3821. Adicionalmente, se realizó análisis de hibridación de ADN complementario (ADNc), para lo cual se seleccionaron varias clonas de bancos sustraetivos que contienen fragmentos de genes de *C. chinense* BG-3821 cuya expresión fue inducida en infecciones de PHYVV. Se demostró que la expresión de los genes correspondientes a los fragmentos R50 y R100 no son sólo inducidos específicamente por la infección de PHYVV, sino además por *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *F. solani*, así como por la aplicación de ácido salicílico, metil jasmonato y etileno. En el análisis de arreglos se observaron diferencias en el nivel de expresión de varios EST para cada condición de estrés evaluada (Barrera et al., 2008).

## **CAPÍTULO III: Desarrollo de la investigación**

Para este estudio se realizó la manipulación directa de las variables en estudio: micrometría estomática, número de hojas. A través del análisis en laboratorio se procedió a la identificación de perfiles genéticos relacionados a la tolerancia a la sequía.

Fue utilizado durante el proceso de evaluación, identificación y selección de los mecanismos de adaptación en las plantas sobrevivientes. Esto permitió evaluar los tiempos de resistencia a la sequía y la capacidad de desarrollarse en condiciones desfavorables.

### ***Observación científica***

Se realizó un diagnóstico para conocer la realidad mediante la percepción directa de los objetos y fenómenos.

Las plantas procedentes del vivero fueron ubicadas en el invernadero del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal De Quevedo, los Ríos Ecuador. Estas muestras se almacenaron en condiciones óptimas para no afectar los parámetros que puedan interferir en la evaluación experimental.

### **Procesamiento y análisis de la información**

#### ***Ficha de laboratorio***

En la misma se recabo toda la información relativa al análisis molecular en el laboratorio: extracción de ADN, estado de las estomas, tamaño de las estomas, entre otros aspectos básicos de la investigación.

#### ***Número de hojas***

Se evaluó el número de hojas de cada tratamiento a los 15, 30, 45, 60 y 75 días después de ser sometidas a estrés hídrico, tomando como punto de partida plantas de 2 meses de edad. Se evaluaron solo hojas

funcionales sin síntomas de patógenos ni heridas provocadas por daño mecánico.

### **Número de brotes**

Se evaluó el número de brotes de forma periódica cada 15 días en los 5 tratamientos, la evaluación se llevó a cabo en todas las plantas correspondientes al tratamiento respectivo de forma directa sin realizar intervenciones como corte del brote o remoción de este.

### **Estado del estoma**

Se determinó la condición morfofisiológica de la estoma correspondiente a cada tratamiento, también se evaluó la condición de apertura como resultado de la deshidratación o reacción ante el estrés hídrico, se emplearon hojas viables que se cubrirán con una fina capa de esmalte que se retiró con ayuda de un bisturí para formar una copia exacta de la condición de la estoma que permitió visualizarlo en un microscopio compuesto de una cámara.

Para la determinación del estado de la estoma se empleó la siguiente tabla:

Tabla 1: Estado estomático

1	Abierto	
2	Semi abierto	
3	Semi cerrado	
4	Cerrado	

### **Elongación del tallo**

Se midió la elongación del tallo en periodos de 15 días desde la base de la raíz hasta la última inserción de las hojas, tomando como referencia el avance longitudinal de cada una de las plantas evaluadas.

### *Estado de la planta*

Se evaluó los estados de estretes estrés hídrico, generando una tabla donde se definirán valores cualitativos del grado de afectación y mortalidad.

Tabla 2: Valores cualitativos del estado de la planta

<b>Grado</b>	<b>Estado</b>
1	Bueno
2	Regular
3	Malo
4	Muerto

Se midió de forma directa el avance del estrés hídrico, donde el grado 1 determina plantas sin afectación alguna en su morfología o filología el grado 2 con defoliación mínima el grado 3 plantas vivas con gran desolación y el grado 4 plantas muertas en su totalidad.

### **Densidad estomática**

Se empleó la metodología descrita por (Hernandez et al, 2006). Seleccionando plantas en estado de floración y fructificación, muestreando segmentos de tejido foliar de 25 cm<sup>2</sup> de la parte media del limbo de cada lado de la quinta hoja, contada desde la hoja bandera hasta la base. Las muestras seleccionadas se preservaron con un fijador

químico, FAA (Formol 75%, Etanol 10% y Ácido Acético glacial 15%). A cada muestra se le realizaron cortes epidérmicos, desprendiendo la cutícula tanto abaxial como adaxial, con hojillas de afeitar nuevas y enteras. Cada corte se colocó en el centro del área grabada de la cámara Newbauer, para evitar la deshidratación rápida del tejido epidérmico, se adicionó 5 ul de agua, luego se tapó la muestra con un cubreobjeto, para así poder ser observado con un microscopio óptico (aumento del ocular 10X y objetivo de 40X).

En las observaciones solo se contabilizaron las estomas tanto del haz y envés que entraban al azar en cada uno de los 25 cuadros de 0,20 mm<sup>2</sup>, que componían el cuadro central de 1 mm<sup>2</sup> de la cámara, se tomó como una patrón los cuadros de las cuatro esquinas y el centro del cuadro central de la cámara, para el conteo y posterior aproximación, evitando que la muestra se mueva de las zonas de observación. El número de estomas observados se calcularon por milímetro cuadrado (e/mm<sup>2</sup>) y los valores tabulados, fueron analizados (ANOVA) bajo paquetes estadísticos InfoStat, para calcular la media, valores máximos y mínimos y correlaciones presentes tanto en el haz como en el envés.

### ***Extracción de ADN***

Se utilizó el Mini kit de DNeasy Plant para las extracciones de ADN genómico, el cual se empleó en las pruebas genéticas posteriores para validar la presencia o ausencia de genes involucrados en la tolerancia al estrés hídrico.

Las extracciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito por el fabricante:

1. Macerar las muestras ( $\leq 100$  mg de peso húmedo o  $\leq 20$  mg de tejido liofilizado) usando el TissueRuptor®, el TissueLyser o un mortero.

2. Agregar 400 µl de tampón AP1 y 4 µl de RNase A. Agitar en vortex e incubar durante 10 min. a 65 ° C. Invierta el tubo 2–3 veces durante la incubación. Nota: No mezcle el Buffer AP1 y la RNase A antes de usar.
3. Añadir 130 µl Buffer AP2. Mezclar e incubar durante 5 min en hielo.
4. Recomendado: Centrifugar la mezcla durante 5 minutos a 20,000 x g. (14.000 rpm).
5. Pipetear la mezcla en una columna de centrifugación QIAshredder colocada en un tubo de colección de 2 ml tubo. Centrifugar durante 2 min a 20.000 x g.
6. Transferir el flujo a un nuevo tubo sin alterar el pellet presente. Agregue 1.5 volúmenes de Buffer AP3 / E, y mezcle por pipeteo.
7. Transferir 650 µl de la mezcla a una columna de centrifugado DNeasy Mini colocada en un tubo de recogida de 2 ml. Centrifugar durante 1 minuto a  $\geq 6000$  x g ( $\geq 8000$  rpm).
8. Eliminar el flujo continuo, repetir este paso con la muestra restante.
9. Colocar la columna de DNeasy mini spin column en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Añadir 500 µl Buffer AW y centrifugar durante 1 minuto a  $\geq 6000$  x g. Eliminar el flujo.
10. Agregar otros 500 µl de tampón AW. Centrifugar durante 2 min a 20.000 x g.
11. Nota: retirar la columna de centrifugado del tubo de recolección evitando que la columna entre en contacto con el flujo continuo.
12. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml.
13. Agregar 100 µl de tampón AE para la elución. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente. (15–25 ° C). Centrifugar durante 1 minuto a  $\geq 6000$  x g.
14. Repetir el paso 13.

Las muestras una vez procesadas fueron corridas en cámara de electroforesis a 95 voltios durante 10 minutos para la confirmación de bandas de ADN.

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de perfiles genéticos asociados a la tolerancia a sequías**

Para los ensayos de amplificación por PCR, se utilizaron las parejas de partidores: OPA 10 - M07 y M07 y A01.

Tabla 3: Parejas de Primers

Código	Secuencia
M 07	5'-CCGTGACTCA-3'
A 01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA 10	5'-GTGATCGCAG-3'

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo termociclador Peltier-based. Las condiciones de amplificación se ajustaron a las temperaturas de Melting ( $T_m$ ) de los primers y a las especificaciones de uso de la enzima Taq DNA Polymerase, siguiendo las recomendaciones del Fabricante (Thermo Scientific, USA 2018).

### **Electroforesis de ADN.**

La separación y validación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio. Los geles se prepararán en tampón TAE (tris, acetato de sodio, EDTA) 1X que contiene: 40 mM Tris-base; 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético.

Los geles se analizaron con un fotodocumentador (E-Gel Imager, Life Technologies) digital que incorpora un transiluminador ultravioleta UVP y una cámara digital de alta resolución.

### **ERIC-PCR perfiles de huellas dactilares**

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne FTC41H2D) adhiriendo 10 µL de aceite mineral en cada tubito de PCR, utilizando el siguiente programa: 94°C por 3 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, por 2 minutos a 37°C, por 2 minutos a 72°C, una elongación final de 72°C por 7 minutos y a 4°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis (ENDURO™ 300V power supply) a 60 voltios por 5:30 horas/min, en gel de agarosa al 2.5%, haciendo uso de buffer TAE 1x [Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M] (Louws et al, 1994).

### **Reactivos para PCR-RAPD**

En la tabla 4 los componentes para el mix de la PCR, los que se realizaron en un volumen total de 20 µl: 4 µl de buffer 5x Cl<sub>2</sub>Mg 50 mM., 1 µl de DNTP 10mM; 0,2 µl de TAQ pol; 1 µl de los iniciadores forward y reverse, respectivamente y 10,8 µl de agua ultrapura. Se utilizaron los reactivos de PROMEGA.

Tabla 4: Componentes de la PCR

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	10,8 µl
Combinación de Iniciadores (2)	1-1 µl
Buffer 5x Mg Cl <sub>2</sub>	4 µl
dNTPs Mix 10x	1 µl
Taq Polimerasa	0,2 µl
ADN Genómico	2 µl
<b>Volumen total</b>	<b>20 µl</b>

## **Programa de PCR**

Las condiciones de amplificación de la PCR fueron aquellas establecidas por (Canchignia et al, 2006) las cuales se presentan en la tabla 5

Tabla 5: Programa de PCR-RAPD

<b>Etapas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
Predesnaturalización	3 minutos	94 °C	1
Desnaturalización	1 minuto	94 °C	40
Alineamiento de iniciadores	2 minutos	37 °C	40
Polimerización	2 minutos	72 °C	40
Extensión final	7 minutos	72 °C	1
Polimerización	5 minutos	4 °C	1

Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de Agarosa al 2,5%, teñido con bromuro de etidio, con un voltaje de 70, por 2 horas 30 minutos y fotografiadas con una cámara digital de luz UV (Life Technologies).

## **Árbol filogenético**

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método UPGMA. El árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 2.18566002. El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Kimura 2-parámetro y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 17 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas eran 1ª + 2ª + 3ª + no codificante. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Hubo un total de 67 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 6

## Diseño de la Investigación

### *Diseño para los datos morfológicos y adaptativos en plantas*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para la adaptación y morfología de las plantas generando 5 tratamientos a evaluar cada una con 5 unidades experimentales realizando 4 repeticiones (Tabla 1).

Tabla 6: Esquema del Análisis de Varianza de datos morfológicos y adaptativos en plantas.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Tratamiento	4
Error	19
Total	23

### *Diseño para los datos morfofisiológicos de las estomas*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para determinar la condición morfo fisiológica de las estomas como producto del estrés hídrico 5 tratamientos a evaluar cada una con 5 unidades experimentales y 4 repeticiones cada uno (Tabla 2).

Tabla 7: Esquema del Análisis de Varianza de datos morfofisiológicos de las estomas

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Tratamiento	4
Error	19
Total	23

## CAPÍTULO IV: Resultados de la investigación

### Evaluación de respuesta morfo fisiológica de *O. pyramidale* sometida a estrés hídrico

#### a) Numero de hojas

Las plantas de *O. pyramidale* que fueron sometidas a los tratamientos de déficit hídrico se observó diferencia significativa entre las evaluaciones para los parámetros fisiológicos. Obteniendo como resultado que a 15 días de la evaluación presentaron similitud en el número de hojas, no obstante, transcurrido los 30 días las plantas sometida a estrés hídrico presentaron una disminución del número de hojas con un promedio de 4 por planta, de igual manera, transcurrido los 45-60-72 días se pudo notar que el número de hojas de las plantas sin riego fueron disminuyendo, presentando de entre 4-3 hojas por planta.

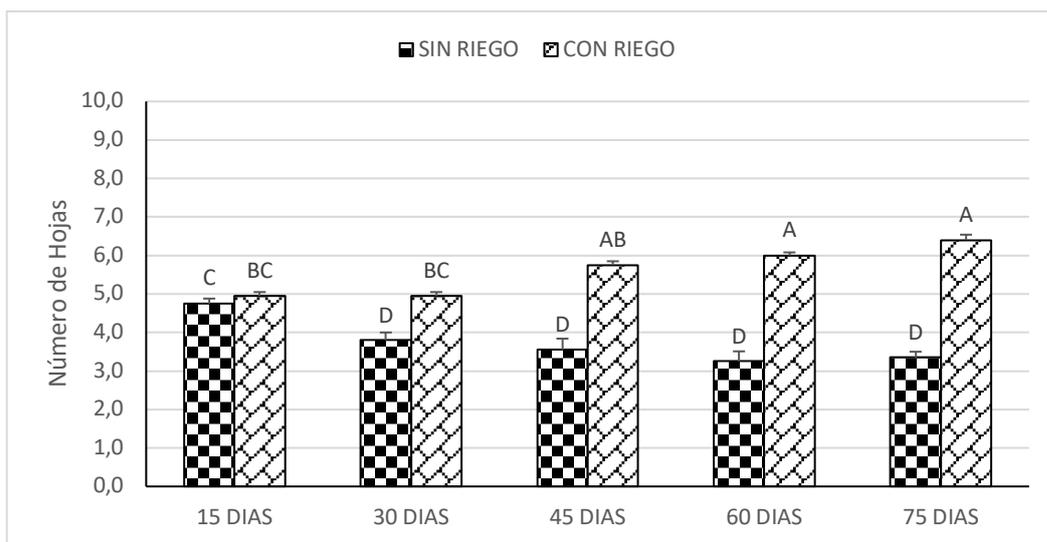


Ilustración 1: Número de hojas en plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento.

### b) Número de Brotes

La evaluación de número de brotes en plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico dio como resultado que en ambos tratamientos a los 15 días de la evaluación presentaron el mismo número de brotes por plantas, este mismo resultado se vio reflejado transcurrido los 30 días, donde ambos tratamientos obtuvieron similar número de brotes por plantas, no obstante, una vez transcurrido los 45-60-75 días de la evaluación el número de brotes en plantas sin riego disminuyó drásticamente presentando promedios de entre 1.6 y 0.95 brotes por planta, estadísticamente inferior en comparación al tratamiento de plantas con riego que presentaron un desarrollo normal y de entre 3.5-3.7 brotes por plantas.

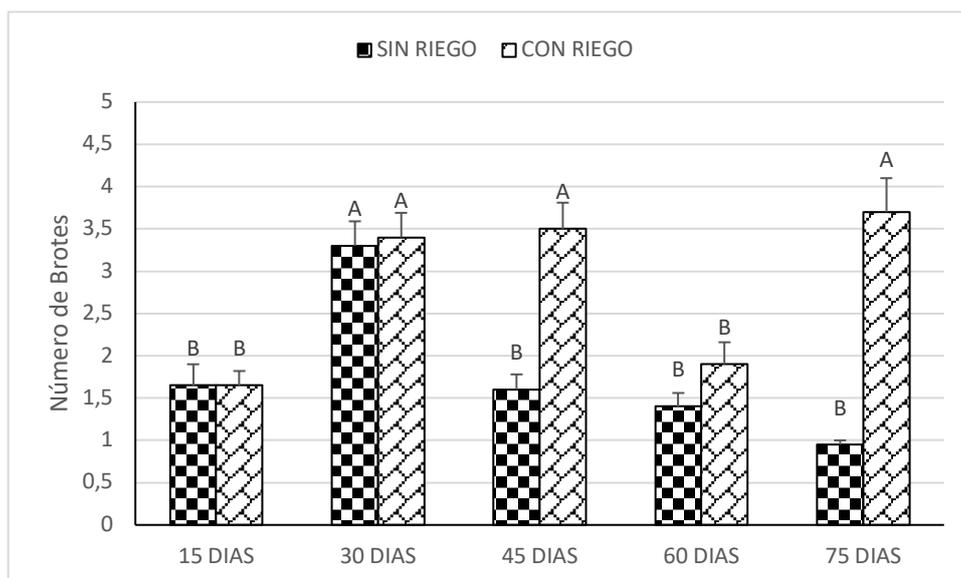


Ilustración 2: Número de brotes en plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento.

### c) Número de estomas

Se contabilizó el número de estomas en hojas de plantas de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico en una superficie de 0,05mm, al recabar los resultados se pudo constatar que el número de estomas de las hojas no variaron significativamente en el transcurso de la evaluación, presentado resultados estadísticamente iguales con promedio de 9.4 y 6.85 estomas en ambos tratamientos.

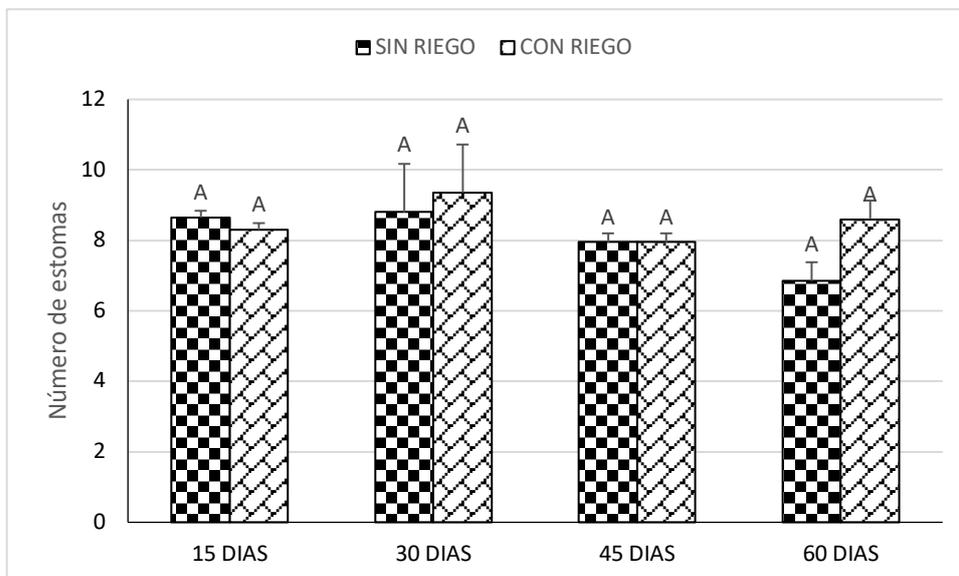


Ilustración 3: Número de estomas en plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento.

### d) Estados de plantas

Al evaluar el estado de las plantas de *O. pyramidales* bajo déficit hídrico, se constató que transcurrido los 75 días las plantas del tratamiento sin riego alcanzaron estado 4 (estado muerto), estadísticamente superior a las plantas con riego que presento un promedio 2,5 en la escala (estado regular).

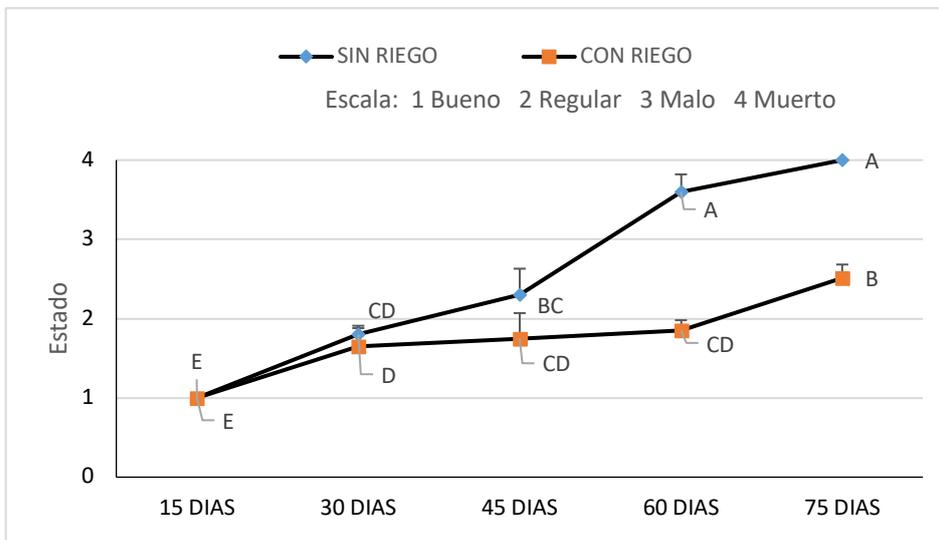


Ilustración 4: Estado de plantas de *O. pyramidale* bajo déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento.

### e) Elongación del tallo

Evaluated the treatments of stem elongation in plants of *O. pyramidale* subjected to water deficit, it was found that both treatments after 15 and 30 days were statistically equal, presenting similarity in the results with averages that vary between the days that range from 12,07 to 15,65 cm, the morphological changes will be presented starting from the 45-60-75 days, where the treatment with presence of irrigation presented the highest average of stem elongation with 18,19 - 19,91 and 21,52 cm, respectively. Statistically superior to the treatments without presence of irrigation, where the plants as

mecanismo ante el déficit hídrico redujo la longitud del tallo presentado promedios de 14,53 -13,73 y 12,18 cm correspondientes a los 45-60-75 días respectivamente.

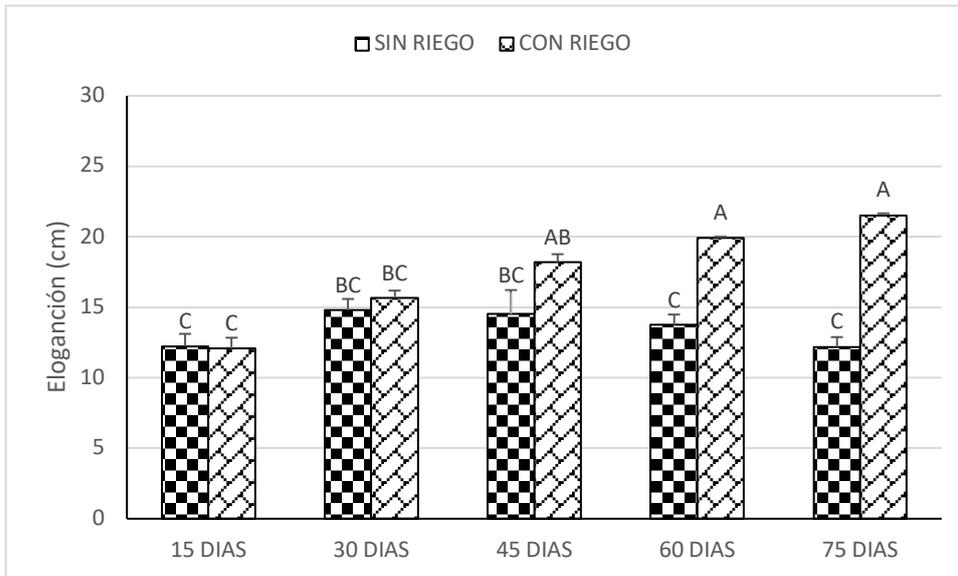


Ilustración 5: Elegancia del tallo de plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento.

#### f) Diámetro del tallo

Evaluated the treatments of stem diameter in plants of *O. pyramidale* under water deficit, it was found that both treatments after 15 and 30 days were statistically equal, presenting similarity in the results with averages that vary between the days that range from 0,26 to 3,38 cm, the morphological changes will be presented starting from the 45-60-75 days, where the treatment with presence of irrigation presented the highest average of stem diameter with 3,80 – 4,43 and 5,0 cm, respectively. Statistically superior to the treatments without presence of irrigation, where the plants as a mechanism against the deficit

hídrico redujo el diámetro del tallo presentando promedios de 2,52 – 1,79 y 1,69 cm correspondientes a los 45-60-75 días respectivamente.

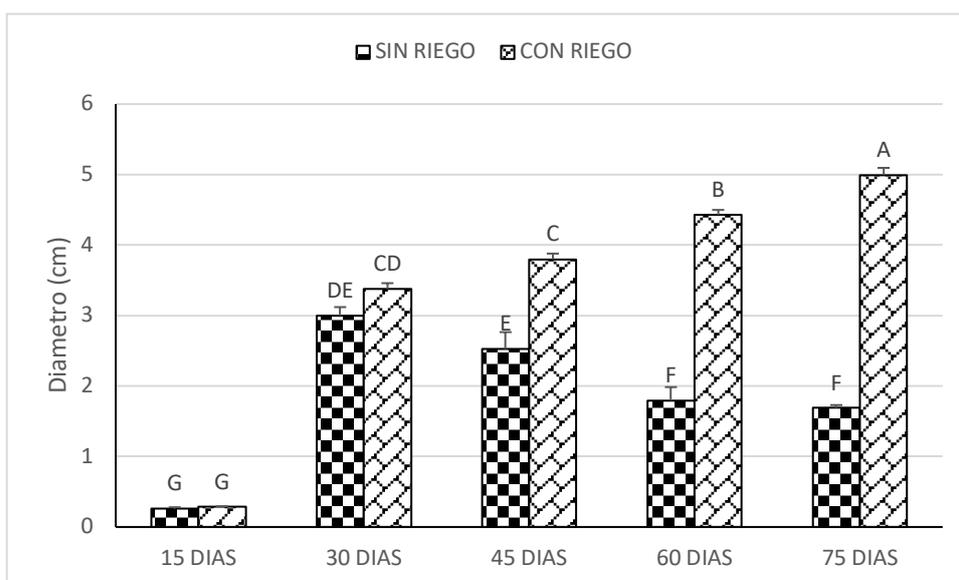


Ilustración 6: Diámetro del Tallo de plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento.

### **Analizar las distorsiones morfológicas estomáticas de *O. pyramidale* ocasionado por la pérdida de agua.**

#### **a) Longitud de estomas**

Los cambios estomáticos en *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico dieron como resultado a 15 días de evaluación en las dos condiciones presentaron similitud en la longitud estomática ya que estos fueron estadísticamente iguales con promedios de 27,48 y 27,96  $\mu\text{m}$ . Observándose cambios en la morfología de las estomas a partir de los 30-45-60 días de la evaluación las plantas en presencia de riego presentan mayor longitud estomática con promedio que van de 29,55 - 31,01 y 31,99  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La balsa como mecanismo de respuesta al estrés

hídrico sus estomas redujeron su longitud manteniéndose entre 22,50 – 24,58 y 23,58  $\mu\text{m}$ , para mitigar la pérdida de agua como mecanismo de adaptación.

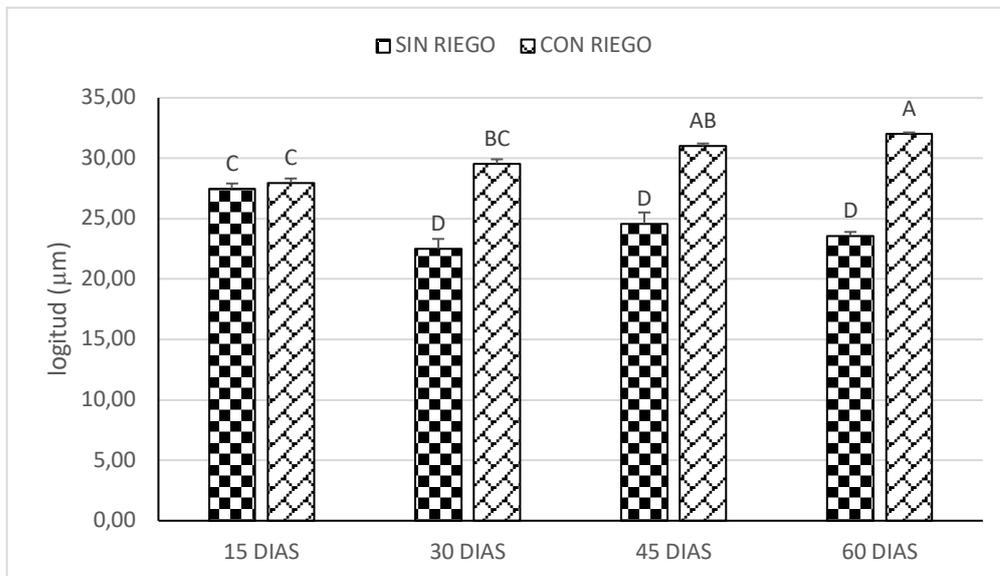


Ilustración 7: Longitud de estomas de hojas de plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento

### b) Diámetro de estomas

Las plantas evaluadas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico dieron como resultado que a los 15 días ambos tratamientos no difieren estadísticamente ya que similares en los promedios con 19,12 y 19,64  $\mu\text{m}$ , por otra parte, transcurrido los 30 días de la evaluación el tratamiento con riego presento un mayor diámetro estomático con 18,68  $\mu\text{m}$ , estadísticamente superior al tratamiento sin riego, así mismo los días posteriores el tratamiento con riego continúa siendo estadísticamente superior con un promedio de 22,63  $\mu\text{m}$  correspondiente a los 30 días y 22,77  $\mu\text{m}$  a los 60 días, respectivamente.

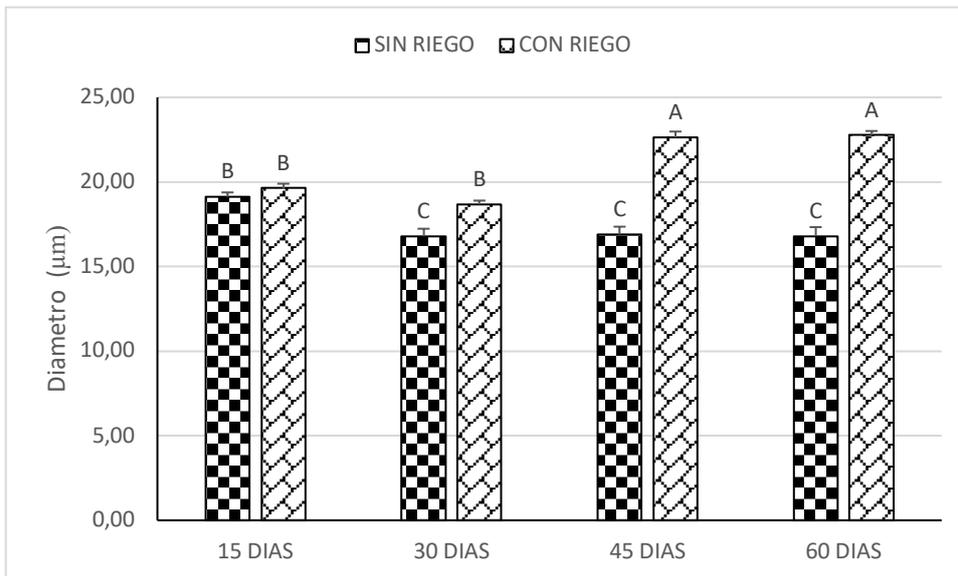


Ilustración 8: Diámetro de estomas de hojas de plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento

### c) Estado de estomas

La evaluación del estado de los estomas de hojas de *O. pyramidale* que fueron sometidas a déficit hídrico, fue evaluada durante 45 días, dando como resultado que a los 15 días ambos tratamientos no presentaron diferencia estadísticas y presentaron el mejor estado estomático ya que alcanzaron promedios similares de entre 1.31 y 1.25 en la escala de estado, Transcurrido los 30 días de la misma forma ambos tratamientos no presentaron diferencias estadísticas ya que obtuvieron promedio de 1.75 y 1.56, así mismo a los 45 días de la evaluación el estado estomático de los tratamientos fueron similares, es decir, estadísticamente igual ya que presentaron promedios de 2.56 y 2.06, respectivamente.

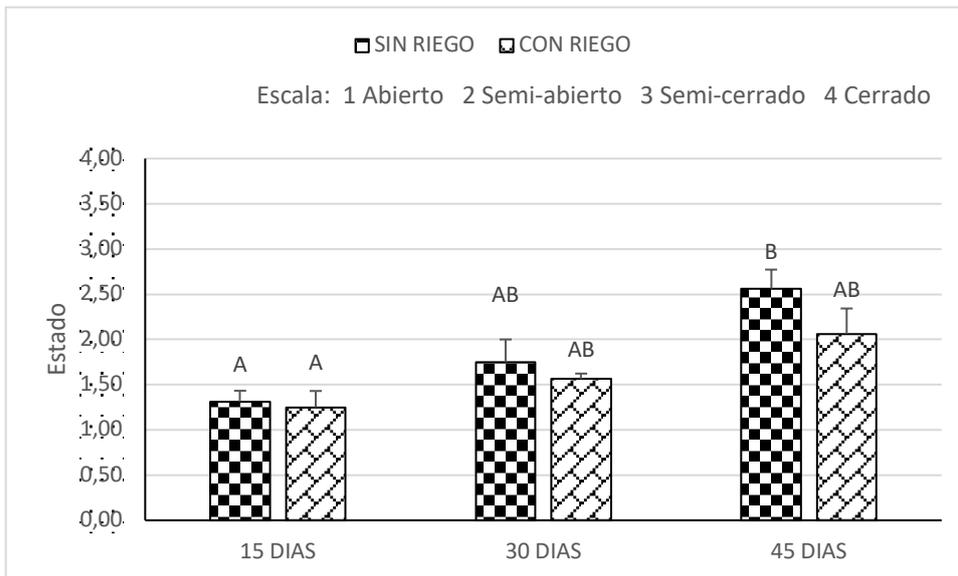


Ilustración 9: Estado de estomas de hojas de plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico.

Los valores con diferente letra representan diferencias estadísticas, a un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). Las barras indican el número de días sometidas a déficit hídrico de cada tratamiento

A continuación, se muestran fotografías tomadas desde el microscopio magnitud x100 a hojas de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico, A. Se observan estomas semi-abiertos a los 15 días de la evaluación, estado de las estomas 1 B. Estomas cerrado y semi-abiertos a los 30 días de la evaluación, estado de las estomas 2. C. Estomas cerrados a los 45 días, estado de las estomas 3, D. Estomas cerrados a los 60 días de la evaluación, estado de estomas 4 debido a la hoja que se encuentra deteriorada.

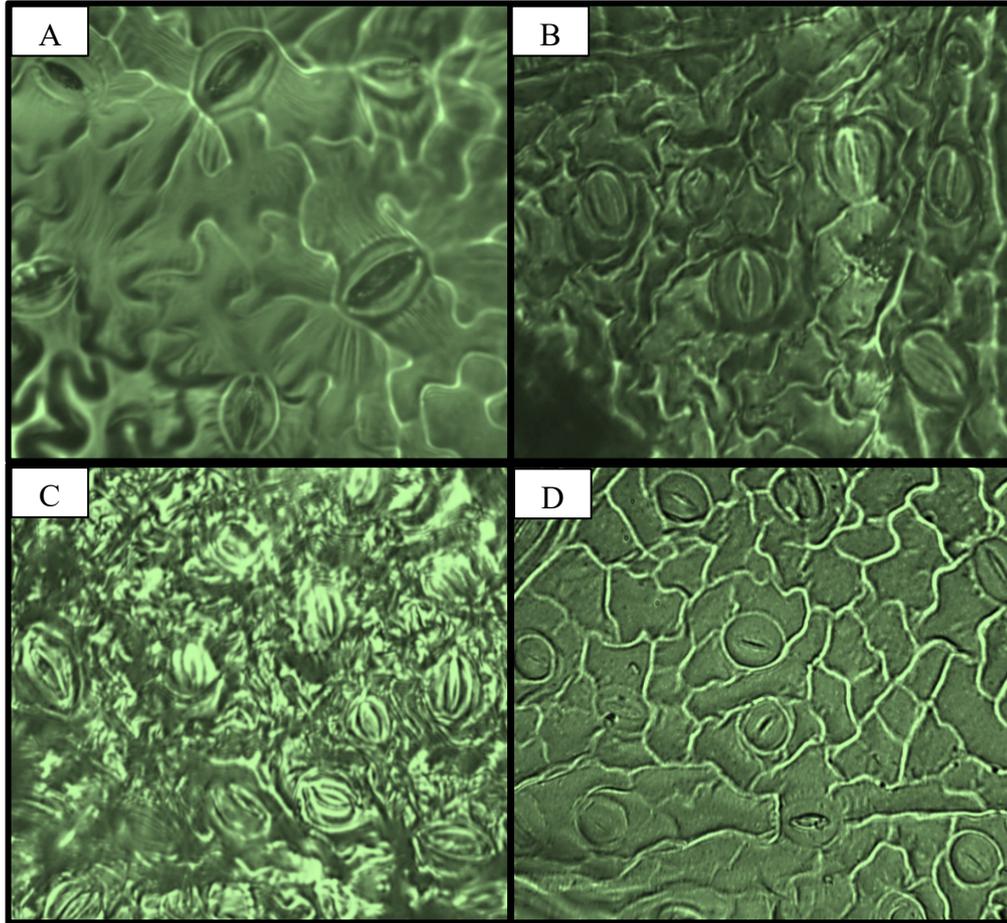


Ilustración 10: Fotografías del estado estomático, A. Estomas semi-abierto 15 días, B. Estomas cerrados y semi-abiertos 30 días, C. Estomas cerrados 45 días, D Estomas cerrados 60 días

## **Generar perfiles genéticos asociados a estrés hídrico *O. pyramidale***

### **a) Muestreo y extracción de ADN genómico de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico**

De las plantas sometidas a estrés hídrico se realizó su extracción de ADN genómico para la búsqueda de perfiles genéticos asociados a plantas con tolerancia a sequias. Obtenido una buena cantidad y calidad de ADN genómico entre 200 ng/100mg de tejido analizado, a partir de *O. pyramidale* de 8 muestras sometidas a estrés hídrico (Figura 12; Anexo 5).

Se puede observar que todas las muestras marcan una sola banda corroborando así que todas pertenecen a la misma especie.

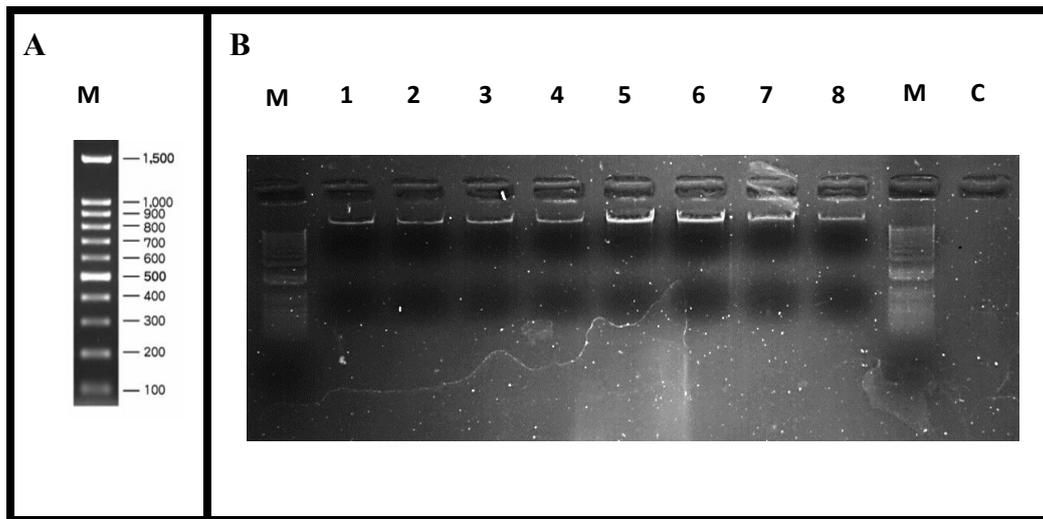


Ilustración 11: Identificación de ADN genómico de *O. pyramidale*. A, marcador de peso molecular (M). B, perfil de amplificación de la 8 muestra de plantas sometidas a estrés hídrico, 15 días (1-2), 30 días (3-4), 45 días (5-6) y 60 días (7-8), marcadores de peso molecu

## **b) Generación de perfiles genéticos aplicando la técnica de biología molecular ERIC-PCR**

Identificación molecular mediante ERIC-PCR al ADN genómico de las 8 muestras de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico generaron un total de 11 bandas que varían en tamaño desde 100 a 1500 pb (Figura 13), mediante la comparación visual de bandas patrones revelaron 2 perfiles distintos entre los 8 aislados evaluados.

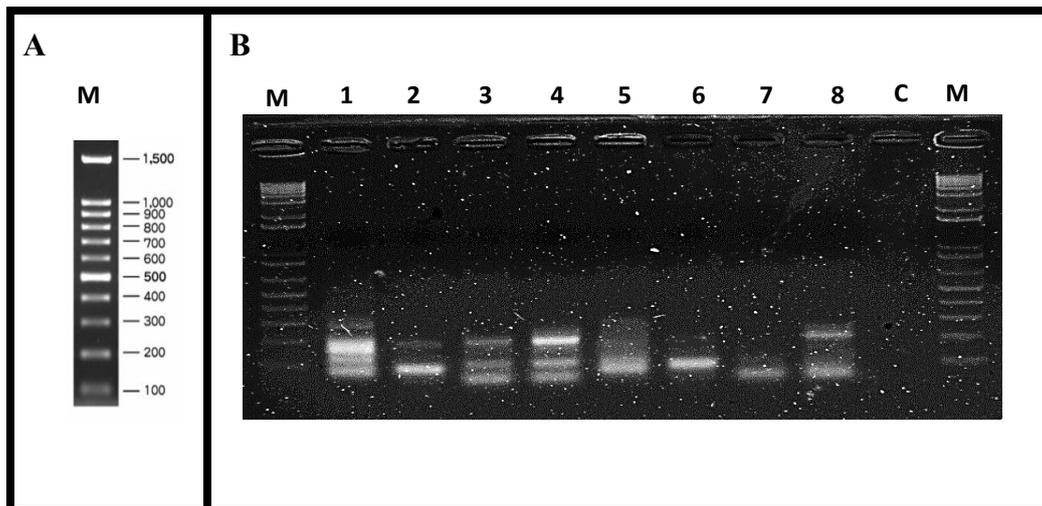


Ilustración 12: Identificación molecular mediante ERIC-PCR al ADN genómico de *O. pyramidale*. A, marcador de peso molecular (M). B, perfil de amplificación de la 8 muestra de plantas sometidas a estrés hídrico, pozo 1 y 2 a 15 días, pozo 3 y 4 a 30 días, pozo 5 y 6 a 4

### **c) Agrupamiento filogenético de las muestras de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico mediante ERIC-PCR**

El resultado del perfil genético obtenido por ERIC-PCR, generó el árbol filogenético a base del modelo Maximum Composite Likelihood donde su dendrograma se fortaleció por un Bootstrap de 1000 repeticiones. Esto procedió a la formación de dos Grupos principales y cuatro subgrupos relacionados a las accesiones que mantienen un grado de tolerancia al estrés hídrico (Figura 14).

En el grupo I, reunió al sub grupo (A) constituido por las plantas Balsa 1, Balsa 5, Balsa 4 y Balsa 8, en este mismo grupo también se encuentra el sub grupo (B) compuesto por las plantas Balsa 2 y Balsa 3, todas estas plantas pertenecientes a los tratamientos de déficit hídrico.

En el grupo II, reunió al sub grupo (C) constituido por las plantas Balsa 6 y Balsa 7, pertenecientes a los tratamientos de déficit hídrico, también se encuentra el sub grupo (D) compuesto por la planta Balsa 9, que fue el control.

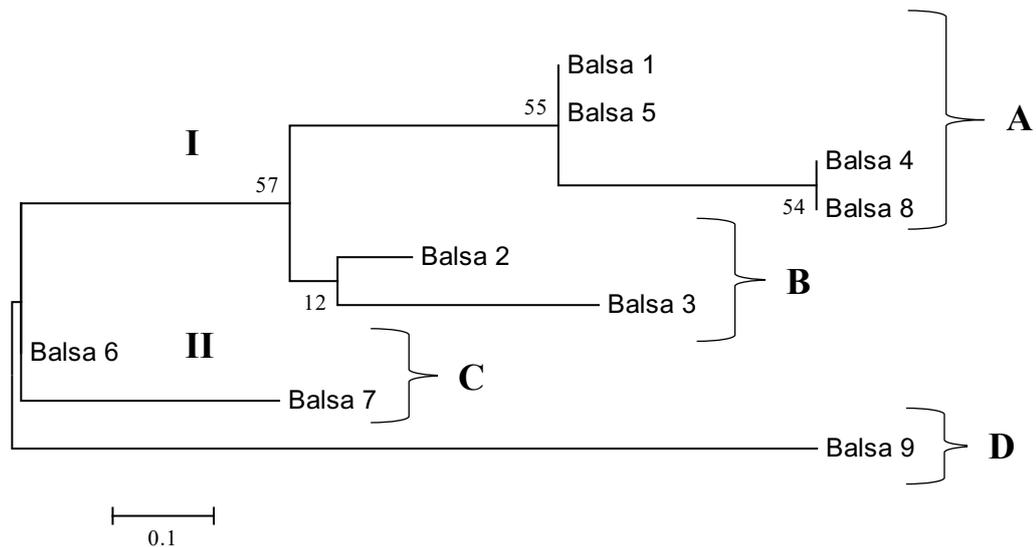


Ilustración 13: Agrupamiento filogenético de las muestras de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico mediante ERIC-PCR.

Dendograma construido a partir del ADN de plantas sometidas a estrés hídrico, La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap

#### **d) Identificación mediante RAPDs**

Identificación molecular mediante RAPDs al ADN genómico de las 8 muestras de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico que generaron un total de 12 bandas que varían en tamaño desde 100 a 1500 pb (Figura 15), mediante la comparación visual de bandas patrones revelaron 3 perfiles distintos entre los 8 aislados evaluados.

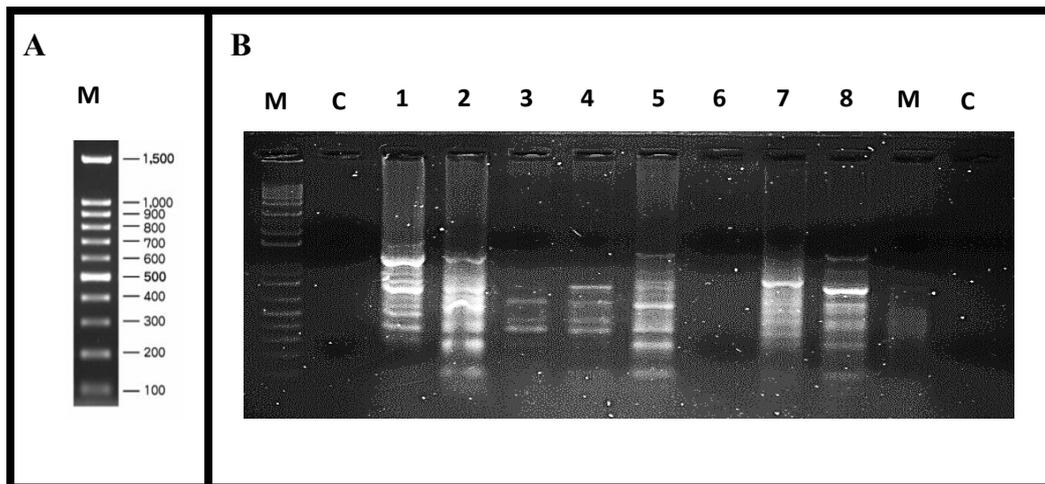


Ilustración 14: Identificación molecular mediante RAPDs al ADN genómico de *O. pyramidale*, A, marcador de peso molecular. B, perfil de amplificación de la 8 muestra de plantas sometidas a estrés hídrico, 15 días (1-2), 30 días (3-4), 45 días (5-6) y 60 días (7-8), marc

#### e) Agrupamiento filogenético de las muestras de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico mediante RAPDs

El análisis de agrupamiento produjo un dendrograma con 2 grupos de las 8 muestras de plantas sometidas a déficit hídrico (Grupo I y II) (Figura 16).

En el grupo I, reunió al sub grupo (A), constituido por las plantas Balsa 2, Balsa 3, Balsa 8, Balsa 9 y Balsa 6, en este mismo grupo se encuentra el sub grupo (B) constituido por la planta Balsa 5, todas estas plantas pertenecientes a los tratamientos de déficit hídrico a excepción de Balsa 9 que es el control.

En el grupo II, reunió al sub grupo (C) constituido por la planta Balsa 4, en este mismo grupo se encuentra el sub grupo (D) constituido por las plantas Balsa 10, Balsa 1 y Balsa 7, también pertenecientes a los tratamientos de déficit hídrico.

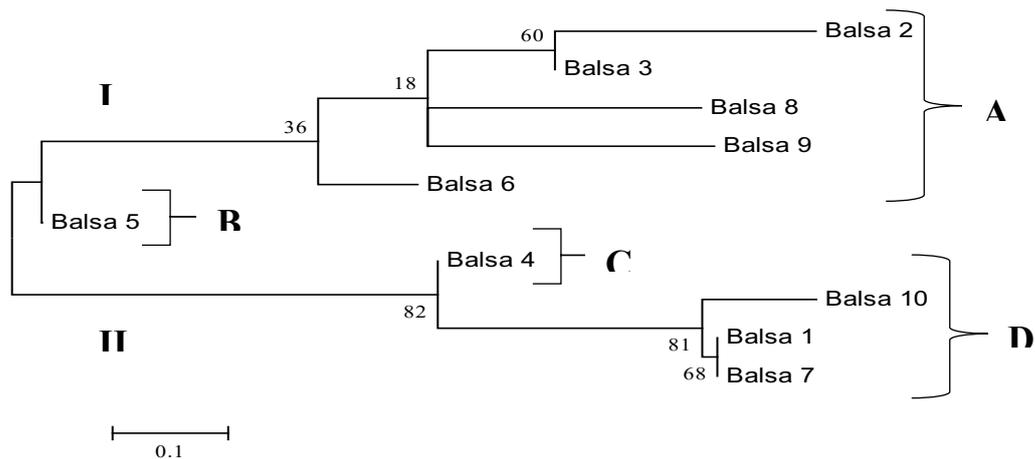


Ilustración 15: Agrupamiento filogenético de las muestras de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico mediante RAPDs.

Dendrograma construido a partir del ADN de plantas sometidas a estrés hídrico, La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap

## Discusión

### ***Examinar la respuesta morfo fisiológica de *O. pyramidale* con ausencia de agua***

#### *Elongación del tallo*

La elongación del tallo de una planta de balsa (*O. pyramidale*) con riego constante durante 35 días y 70 días, según (Parrales, 2012), alcanza una longitud de 29,59 cm y 53, 96 cm, respectivamente. Estas longitudes son superiores a los alcanzados en los tratamientos en plantas con déficit hídrico, ya que estas solo alcanzaron alturas de 14,79 cm para los 30 días y 12,18 cm para los 70 días sin riego.

De acuerdo con los resultados se puede hacer un contraste de que existe una gran diferencia en las características morfo físicas a partir de los 30 días de estrés hídrico.

A medida que va disminuyendo el contenido hídrico de la planta lo hace también el de las propias células, de modo que disminuye el volumen celular y la turgencia de la célula. La pared celular se vuelve inflexible, limitando así el crecimiento y desarrollo (Hsiao, 1973).

### *Diámetro del tallo*

El diámetro del tallo de la balsa (*O. pyramidale*) en condiciones normales de riego según (Almagro de la Cueva & Jiménez Jiménez, 2013), se presentan los datos obtenidos de diámetro de la balsa, para cada tratamiento, a los 80 días se obtuvieron promedios de 3.04 y 3.38 cm, estos resultados fueron superiores a los obtenidos en los tratamientos de plantas sometidas a estrés hídrico por 75 días que alcanzaron un promedio de 1,69 cm.

Es importante mencionar que las plantas con estrés hídrico a los 75 días se encontraban en un estado de senescencia y que a los 45 días de déficit hídrico había obtenido un resultado superior de 2,52 cm.

Por lo que se puede constatar que a partir de los 45 días de estrés hídrico el diámetro del tallo irá disminuyendo progresivamente.

### ***Identificar genes relacionados a la tolerancia del estrés hídrico empleando técnicas moleculares***

#### *Identificación mediante ERIC-PCR*

En la identificación molecular mediante ERIC-PCR se encontró variabilidad en 2 de los perfiles de amplificación, después de realizar el agrupamiento filogenético, agrupando en el subgrupo 2 a Balsa 6 (plantas sometidas a estrés hídricos 45 días) y Balsa 7 (plantas sometidas a estrés hídricos 60 días), esto pudo haber sido por que las plantas sometidas a largos periodos de déficit hídrico expresan genes que producen proteínas y enzimas para soportar largos periodos de ausencia de agua, (Bray, 1997), mencionan que Una de las principales respuestas

al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico.

## CAPÍTULO V: Conclusiones

Las plantas de *O. pyramidale* (balsa) que son sometidas a más de 45 días de déficit hídrico presenta hasta un 50% menos de área foliar, lo que significa que se altera sus características morfo físicas.

La cantidad total de brotes en plantas de *O. pyramidale* sometidas a déficit hídrico se disminuye drásticamente transcurrido los 45 días, presentado hasta un 60% menos de brotes generados.

El número total de estomas de *O. pyramidale* sometidas a estrés hídrico y en comparación con plantas con riego constante, presentado un total de 6 y 8 estomas en una superficie de 0,05 mm, es decir, que no se modifica la cantidad de estomas encontrados en una planta con déficit hídrico.

A nivel estomático existe variación de las características morfo físicas en plantas con déficit hídrico, a partir de los 30 días la longitud y diámetro de estomas es menor con 22,50  $\mu\text{m}$  y 16,79  $\mu\text{m}$  mientras que una planta con riego constante la longitud es significativamente mayor con 29,55  $\mu\text{m}$  y 18,68  $\mu\text{m}$ .

Las plantas sometidas por 30 días a déficit hídrico presento mayor respuesta molecular en el perfil de amplificación de RAPDs, agrupándose filogenéticamente en un sub grupo diferente a los demás tratamientos, esto se puede atribuir a la expresión de genes de producción de enzimas o proteínas de adaptación al estrés hídrico.

## Referencias bibliográficas

- Alice, F., Montagnini, F., & Montero, M. (2004). Productividad en plantaciones puras y mixtas de especies forestales nativas en la Estación Biológica La Selva, Sarapiquí, Costa Rica. *Agronomía costarricense*, 28(2).
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool (BLAST). *Molecular Biology Journal*, 215(3), 403-410.
- Barrera-Pacheco, A., Joaquín-Ramos, A. D. J., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Pérez-Pérez, M., Cristina, I., ... & Guevara-González, R. G. (2008). Análisis de la expresión transcripcional inducida bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en *Capsicum chinense* BG-3821. *Agrociencia*, 42(1), 95-106.
- Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2017). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Trayectos*.
- Camel, V., Galeano, E., & Carrer, H. (2017). Red de coexpresión de 320 genes de *Tectona grandis* relacionados con procesos de estrés abiótico y xilogénesis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 5-14.
- Díaz Hernández, Y., Torres de la Noval, W., Rodríguez Cabello, J., & Rodríguez Hernández, P. (2014). Respuesta de plantas de papaya silvestre (*Carica cubensis* Solms) al estrés hídrico y su recuperación: aspectos fisiológicos y del crecimiento. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 55-61.
- Florido Bacallao, M., & Bao Fundora, L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 35(3), 70-88.
- Gabriel, J., Porco, P., Angulo, A., Magne, J., La Torre, J., & Mamani, P.

(2016). Resistencia genética a estrés hídrico por sequía en variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo invernadero. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 16(2), 173-208.

Gonzales, Ana. (2013). "Morfología de Planas Vasculares." *Botánica morfológica*: 1-10.  
<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema13/13-4estomas.htm>  
(October 14, 2018).

González Osorio, B. G., Molina, X. C., Navarrete, E. T., Fonseca, C. S., & Ochoa, L. S. (2010). Caracterización del cultivo de balsa (*Ochroma Pyramidale*) en la Provincia de los Ríos-Ecuador. *Revista Ciencia y Tecnología*, 3(2), 7-11.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, INEC. (2010). "Resultados Del Censo (2010). de Población Y Vivienda En El Ecuador. Fascículo Provincial Los Ríos." *Inec*: 8.

Jaramillo, Alvarado. (2007). Evapotranspiración de Referencia En La Región Andina de Colombia. *Cenicafe* 57(4): 288-98.  
<http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/232/1/arc057%2804%29288-298.pdf> (October 14, 2018).

Lorente, Acosta, J. A. L. (1997). Nuevas perspectivas en paleopatología a través de la genética. In *La enfermedad en los restos humanos arqueológicos: actualización conceptual y metodológica: actas del IV Congreso Nacional de Paleopatología (San Fernando, 2-5 Octubre 1997)* (pp. 125-140). Fundación Municipal de Cultura del Ayuntamiento de San Fernando.

Martinez, C. F., Cavagnaro, J. B., Roig Juñent, F. A., & Cantón, M. A. (2013). Respuesta al déficit hídrico en el crecimiento de forestales del bosque urbano de Mendoza. Análisis comparativo en árboles jóvenes. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 45(2).

- Martínez Trinidad, T., Vargas Hernández, J., Muñoz Orozco, A., & López Upton, J. (2002). Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: consumo de agua y crecimiento en plántulas de diferentes poblaciones. *Agrociencia*, 36(3).
- Montenegro Jhon. (2018). Respuestas moleculares frente al déficit hídrico en diferentes combinaciones de patrones e injertos de *Theobroma cacao* (cacao), quevedo, 2018, Universidad Tecnica Estatal de Quevedo.
- Montoya, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11131> (October 14, 2018).
- Nogueira, R. J. M. C., Silva Junior, J. D., Bezerra, J. E. F., Lederman, I. E., Burity, H. A., & Santos, V. D. (2000). Comportamiento estomático y tensión de agua en el xilema de dos genotipos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) cultivados bajo estrés hídrico. *Investigacion Agrária: Production y Proteccion Vegetal*, 15(3).
- Núñez, M., Mazorra, L. M., Reyes, Y., & Martínez, L. (2010). Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos: Una visión actualizada. *Cultivos Tropicales*, 31(2), 00-00.
- Ojeda-Bustamante, W., Sifuentes-Ibarra, E., Íñiguez-Covarrubias, M., & Montero-Martínez, M. J. (2011). Impacto del cambio climático en el desarrollo y requerimientos hídricos de los cultivos. *Agrociencia*, 45(1), 1-11.
- Oshiro Chinen, Magnolia. (2014). Ficha Estándar de Familia Del Catálogo de Bienes, Servicios Y Obras Del MEF : 1-4. [https://www.mef.gob.pe/contenidos/doc\\_siga/catalogo/ctlogo\\_f](https://www.mef.gob.pe/contenidos/doc_siga/catalogo/ctlogo_f)

amilias\_madera\_topa\_balsa.pdf (October 21, 2018).

- Pejić, B., Maksimović, L., Škorić, D., Milić, S., Stričević, R., & Čupina, B. (2009). EFFECT OF WATER STRESS ON YIELD AND EVAPOTRANSPIRATION OF SUNFLOWER/EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL RINDE Y APOTRANSPIRACIÓN DE GIRASOL/EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LE RENDEMENT ET L'ÉVAPOTRANSPIRATION DU TOURNESOL. *Helia*, 32(51), 19-32.
- Rojas-Rodríguez, F., & Torres-Córdoba, G. (2008). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Bala de cañón. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 5(15), 63-65.
- Romero-Carpio, M., & Estrada-Jiménez, R. (2005). Selección de fragmentos diferenciales de ADNc relacionados con estrés hídrico en *Ullucus tuberosus* Loz:(Bassellaceae)«olluco». *Revista Peruana de Biología*, 12(1), 135-140.
- Suarez, Padrón, I. E. S., Orozco, A. D. J. J., & Avila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Temas Agrarios*, 11(2), 6.
- Suárez, L. C., Fonseca, A. Á., & Fernández, R. R. (2012). Puntos sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 47-57.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids*, 25(24), 4876-4882.

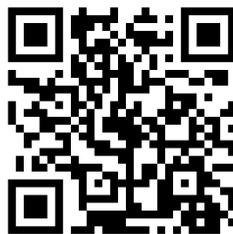
Turhan, H., & Baser, I. (2004). In vitro AND In vivo WATER STRESS IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.)/ESTRÉS HÍDRICO EN GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) EN LAS CONDICIONES in vitro e in vivo/STRESS D'EAU DU TOURNESOL (*Helianthus annuus* L.) DANS LES CONDITIONS In vitro ET In vivo. *Helia*, 27(40), 227-236.

Villar, Salvador, P. V., Peñuelas, J., Carrasco, I., Domínguez, S., & Renilla, I. (1997). Relaciones hídricas y potencial de formación de raíces en plántulas de *Pinus halepensis* Mill. sometidas a diferentes niveles de endurecimientos por estrés hídrico. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, (4).

Villar, Salvador, P. V., Rubira, J. L. P., & Manzano, I. C. (2000). Influencia del endurecimiento por estrés hídrico y la fertilización en algunos parámetros funcionales relacionados con la calidad de la planta de *Pinus pinea*. In *Actas del 1er Simposio sobre el pino piñonero. Valladolid* (Vol. 1, pp. 211-218).

## ***Descubre tu próxima lectura***

Si quieres formar parte de nuestra comunidad, regístrate en <https://www.grupocompas.org/suscribirse> y recibirás recomendaciones y capacitación



   @grupocompas.ec  
compasacademico@icloud.com

compAs  
Grupo de capacitación e investigación pedagógica



@grupocompas.ec  
compasacademico@icloud.com

