



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: “EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE LA SEMILLA DE CHOCHO  
(*Lupinus mutabilis*) POSTERIOR A LA DESINFECCIÓN POR RADIACIÓN  
SOLAR”**

**AUTOR: CHÁVEZ BENALCÁZAR, EDUARDO DAVID**

**DIRECTOR: FALCONÍ SAÁ, CÉSAR EDUARDO PhD.**

**SANGOLQUÍ**

**2018**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, ***“EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE LA SEMILLA DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) POSTERIOR A LA DESINFECCIÓN POR RADIACIÓN SOLAR”*** fue realizado por el señor ***Chávez Benalcázar, Eduardo David***, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 14 de mayo del 2018**

**César Falconí Saá PhD.**

C.C 0601556459

DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, *Chávez Benalcázar, Eduardo David*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “*Evaluación enzimática de la semilla de chocho (Lupinus mutabilis) posterior a la desinfección por radiación solar*” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

**Sangolquí, 14 de mayo del 2018**

---

**CHÁVEZ BENALCÁZAR, EDUARDO DAVID**

C.C 1723211254



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORIZACIÓN**

*Yo, **Chávez Benalcázar, Eduardo David** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar trabajo de titulación: “**Evaluación enzimática de la semilla de chocho (*Lupinus mutabilis*) posterior a la desinfección por radiación solar**” en el repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.*

**Sangolquí, 14 de mayo del 2018**



**CHÁVEZ BENALCÁZAR, EDUARDO DAVID**

C.C 1723211254

## **DEDICATORIA**

A Caroline, que durante estos años ha sido mi compañera sincera, fiel y sobre todo amorosa que sin importar nuestras diferencias culturales ni de idioma me ha apoyado completamente en cada uno de mis proyectos y me ha amado pura y sobre todo pacientemente. Te amo Caroline, gracias por ser lo mejor que me ha pasado en mi vida.

**EDUARDO**

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer infinitamente al Doctor César Falconí por permitirme desarrollar este trabajo, el cual me permitió finalizar mi proceso de formación profesional de la mejor manera. Quiero agradecerle infinitamente por su apoyo y guía durante todo este proceso.

Agradezco a la Carrera Agropecuaria IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por la formación integral y profesional que he recibido por parte de sus profesores. A mis amigos del IASA que han hecho que estos casi 6 años hayan pasado alegremente.

Agradezco al programa “Mejora de la cadena productiva del chocho (*Lupinus mutabilis*) en Ecuador” financiado por la SENESCYT, dirigido por el Doctor Cesar Falconí, por permitirme aportar con un pequeño granito de arena por medio de los resultados de mi investigación, los cuales espero que puedan ser utilizados de la mejor manera para mejorar la productividad de los medianos y pequeños productores de chocho de la sierra ecuatoriana.

A la Doctora Viviana Yáñez, codirectora del programa, quien me abrió las puertas de su laboratorio en la Universidad de las Américas (UDLA) y poder realizar los análisis de laboratorio.

J'aimerais aussi remercier mes beaux-parents, Michel et Sylvie, qui m'ont soutenu et aidé pendant ces années. Merci pour votre patience et confiance en moi.

Por último, quisiera agradecer eternamente a Darwin Claudio, quien me apoyó y direccionó en cada instante del desarrollo de este trabajo, y se convirtió en uno de mis mejores amigos que me deja el IASA.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### CARÁTULA

<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	<b>i</b>
<b>AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD</b> .....	<b>ii</b>
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>

### CAPÍTULO I

#### INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	2
1.2.1 Causas .....	3
1.2.2 Efectos .....	3
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general .....	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
1.5 Hipótesis .....	5

### CAPÍTULO II

#### REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre el chocho .....	6
2.2 Características de la variedad INIAP – 450 Andino .....	7
2.3 Radiación solar .....	8
2.4 Radiación solar en semillas .....	8
2.5 Características de proteína posterior a la radiación solar .....	9
2.6 Vigor de las semillas posterior a la radiación solar .....	10

2.7	Características de la plúmula y radícula de la semilla de chocho .....	11
2.8	Enzima Peroxidasa .....	12
2.9	Enzima Proteosoma 20S.....	13

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Ubicación del lugar de la investigación.....	14
3.1.1	Ubicación Política .....	14
3.1.2	Ubicación geográfica.....	14
3.1.3	Ubicación ecológica .....	14
3.2	Diseño Experimental .....	15
3.2.1	Factores.....	15
3.2.2	Estructura de parcelas.....	16
3.2.3	Estructura de tratamientos .....	16
3.2.4	Unidad experimental .....	16
3.2.5	Características de la unidad experimental .....	16
3.2.6	Croquis del experimento.....	17
3.2.7	Unidades muestrales .....	17
3.2.8	Variables de estudio .....	17
3.3	Radiación Solar .....	18
3.3.1	Materiales para realizar la radiación solar en semillas .....	18
3.3.2	Funcionamiento de la estufa de fabricación casera .....	19
3.3.3	Metodología para inducir la radiación solar en semillas .....	20
3.4	Determinación de Humedad .....	21
3.4.1	Materiales para la determinación de humedad en las semillas.....	21
3.4.2	Metodología para la determinación de humedad en las semillas .....	21
3.5	Obtención radículas .....	21
3.5.1	Materiales para la obtención de radículas .....	21
3.5.2	Metodología para la obtención de radículas.....	22
3.6	Obtención de plúmulas .....	23
3.6.1	Materiales para la obtención de plúmulas .....	23
3.6.2	Metodología para la obtención de plúmulas.....	24



3.7	Obtención extractos líquidos puros .....	25
3.7.1	Materiales para la obtención de extractos líquidos puros.....	25
3.7.2	Metodología para la obtención de extractos líquidos puros .....	26
3.8	Determinación del porcentaje de germinación .....	26
3.8.1	Materiales para la determinación del porcentaje de germinación .....	26
3.8.2	Metodología para la determinación del porcentaje de germinación.....	26
3.9	Determinación del contenido de proteína.....	26
3.9.1	Materiales para la determinación del contenido de proteína .....	26
3.9.2	Metodología para la determinación del contenido de proteína .....	27
3.10	Determinación de la actividad de peroxidasa.....	30
3.10.1	Materiales para la determinación de la actividad de peroxidasa .....	30
3.10.2	Metodología para la determinación de la actividad de peroxidasa.....	31
3.11	Determinación de la actividad de proteosoma 20S .....	33
3.11.1	Materiales para la determinación de la actividad de proteosoma 20S.....	33
3.11.2	Metodología para la determinación de la actividad de proteosoma 20S .....	33

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

4.1	Radiación solar acumulada.....	35
4.2	Contenido de Humedad .....	36
4.3	Porcentaje de germinación .....	37
4.4	Contenido de proteína.....	38
4.5	Cuantificación de la actividad de peroxidasa .....	40
4.6	Cuantificación de la actividad de proteosoma 20S.....	42

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

6.1	Conclusiones.....	47
6.2	Recomendaciones .....	48
6.3	Bibliografía.....	49

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> <i>Tratamientos aplicados a semilla de chocho del genotipo INIAP-450</i> <i>ANDINO para su evaluación enzimática. ....</i>	<i>16</i>
<b>Tabla 2</b> <i>Características de las unidades experimentales.....</i>	<i>17</i>
<b>Tabla 3</b> <i>Preparación de la curva estándar para la determinación de proteína por</i> <i>espectrofotometría .....</i>	<i>27</i>
<b>Tabla 4</b> <i>Absorbancias de los estándares para la curva de calibración en la</i> <i>cuantificación .....</i>	<i>29</i>
<b>Tabla 5</b> <i>Preparación de curva de calibración para la medición de la actividad.....</i>	<i>32</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Fotografía Hacienda el Prado – IASA I (Lugar de investigación).....	15
<b>Figura 2</b> Croquis experimental del ensayo .....	17
<b>Figura 3</b> Diagrama de la estufa de fabricación casera diseñada por C. Falconí.....	19
<b>Figura 4</b> Curva de calibración para el contenido de proteína.....	29
<b>Figura 5</b> Radiación solar acumulada y temperatura alcanzada dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente.....	35
<b>Figura 6</b> Porcentaje de Humedad de la semilla de chocho INIAP-450 ANDINO posterior a la radiación solar.....	36
<b>Figura 7</b> Porcentaje de germinación de la semilla de chocho INIAP-450 ANDINO posterior a la radiación solar .....	37
<b>Figura 8</b> Contenido proteico de las radículas obtenidas de semillas del genotipo INIAP-450 ANDINO.....	38
<b>Figura 9</b> Contenido proteico de las plúmulas obtenidas de semillas del genotipo INIAP-450 ANDINO.....	39
<b>Figura 10</b> Cuantificación de la actividad de peroxidasa de radículas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 - ANDINO.....	40
<b>Figura 11</b> Cuantificación de la actividad de peroxidasa de plúmulas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 - ANDINO.....	41
<b>Figura 12</b> Cuantificación de la actividad de proteosoma 20S de radículas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 – ANDINO .....	42
<b>Figura 13</b> Cuantificación de la actividad de proteosoma 20S de plúmulas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 – ANDINO .....	43

## RESUMEN

El chocho es un cultivo andino que ha sido cultivado en Ecuador desde épocas precolombinas y mantiene su importancia hasta la actualidad por su alto contenido de proteína. La incidencia de enfermedades en la semilla de chocho ha generado disminución en la productividad y rentabilidad de medianos y pequeños agricultores productores de chocho en las últimas décadas. La radiación solar es una alternativa al pretratamiento de semilla de chocho para su desinfección y promoción de vigor. La radiación solar genera una situación de estrés en las semillas, que activa la actividad enzimática de peroxidasa y proteosoma 20S, promoviendo la capacidad de reconstruir y reformular proteínas, gracias a la presencia de aminoácidos libres producto de proteínas dañadas o alteradas en el momento de la radiación solar. Este estudio tuvo el objetivo de evaluar tres tiempos de exposición a radiación solar tanto dentro de una estufa de fabricación casera como al ambiente, contrastándolos con un control que no tuvo ningún tipo de radiación solar. El tratamiento con 30 minutos de exposición a radiación solar dentro de una estufa de fabricación casera promovió el mayor vigor de semilla de chocho del genotipo I-450 Andino, al presentar aumentos significativos en el porcentaje de germinación, contenido de proteína y actividad enzimática de peroxidasa.

### **PALABRAS CLAVES:**

- **CULTIVO ANDINO**
- **SEMILLAS DE CHOCHO**
- **GENOTIPO INIAP – 450 ANDINO**
- **RADIACIÓN SOLAR**
- **EVALUACIÓN ENZIMÁTICA**

## **ABSTRACT**

The lupine is an Andean crop harvested in Ecuador since the Precolombian period. The lupine conserves its importance to the date due to its high protein content. The presence of diseases in the seeds of lupine caused less productivity and profitability of small and medium lupine producers in the past decades. Solar irradiation is an alternative lupine seed treatment for disinfection and vigor promotion. Solar irradiation causes a stress situation in seeds which activates the enzymatic activity of peroxidase and proteasome 20S. These enzymes promote the capability of rebuilding and reformulating proteins, thanks to the free radicals of damaged and injured proteins resulting from solar irradiation. The aim of this study was to evaluate three durations of solar irradiation inside a homemade oven and to air-free environment, compared to a control without solar irradiation. The treatment with 30 minutes of exposure to solar irradiation inside a homemade oven resulted in the highest values of vigor in the lupine seeds of the genotype INIAP-450 ANDINO. This treatment promoted higher values of seed germination, protein content and peroxidase activity.

### **KEY WORDS:**

- **ANDEAN CROP**
- **LUPINE SEEDS**
- **GENOTYPE INIAP – 450 ANDINO**
- **SOLAR IRRADIATION**
- **ENZYMATIC EVALUATION**

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El chocho (*L. mutabilis*) es una leguminosa que presenta un alto contenido proteico (aproximadamente 46% en grano seco) con respecto al resto de leguminosas y otros cereales andinos (Caicedo & Peralta, 2000). El chocho es utilizado únicamente como alimento humano en Ecuador, a diferencia de Australia y el Mediterráneo donde la variedad adaptada es *Lupinus angustifolius*, y es cultivado principalmente como fuente proteica en piensos para animales de granja (Australian Government, 2013) & (Walker, Herthel, Parker, & Edwards, 2011). El chocho contribuye con cantidades considerables de fósforo, hierro y zinc; por tal razón, es considerado como un alimento estratégico que contribuye a la soberanía alimentaria de los ecuatorianos. En el territorio ecuatoriano, el chocho es cultivado únicamente en la región Sierra, el cual es sembrado como monocultivo mayoritariamente, pero también se lo encuentra en asociación con otros cultivos andinos (Caicedo & Peralta, 2000).

En vista de ser uno de los granos andinos más nutritivos y potencialmente rentables para sus productores con las técnicas adecuadas, hace varios años se creó el programa de la “Mejora de la cadena productiva del chocho en Ecuador” que constituye una alianza estratégica entre la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, la Universidad de las Américas (UDLA) y la Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC) que tiene el objetivo de impulsar el desarrollo sostenible de la producción, procesamiento y consumo del chocho, con el auspicio de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) (www.gipchocho, 2015).

El programa de la “Mejora de la cadena productiva del chocho en Ecuador” se ha enfocado en realizar investigaciones que contribuyen con el pequeño y mediano productor de chocho, desarrollando nuevas tecnologías para conseguir menor incidencia de enfermedades, mayores rendimientos y por consiguiente una mejoría económica para los productores.

## **1.2 Planteamiento del problema**

El chocho es cultivado principalmente en las provincias de Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, Bolívar, Tungurahua, Carchi e Imbabura; donde la producción promedio alcanza 200 kg/ha sin uso de ninguna tecnología de siembra ni de cosecha (Falconí, 2012).

Estos bajos rendimientos promedios provocan que los pequeños y medianos productores de esta leguminosa estén desmotivados a cultivarlo y en muchas ocasiones no consiguen un rédito económico aceptable con respecto a lo invertido.

Hoy en día, existen varios métodos de desinfección de semilla para reducir la presencia de microorganismos fitopatógenos. El principal método usado por productores de esta leguminosa es el método químico por su eficaz acción desinfectante de semilla (Caicedo, Peralta, & Rivera, 2001); sin embargo, este método es en muchos de los casos inaccesible para pequeños productores por sus altos costos de implementación. Adicionalmente, el uso de químicos desinfectantes de semilla está relacionado con un alto riesgo a la salud de los operarios agrícolas que los manejan, así como elemento contaminante del medio ambiente y adicionalmente los fungicidas no erradican al patógeno de la semilla por completo (Chen, 2006).

Ante la necesidad de poseer una semilla completamente libre de microorganismos patógenos, han surgido varias alternativas a los métodos químicos. Una de ellas es el uso de la radiación solar, con la cual, en estudios anteriores se ha comprobado la reducción significativa de la

antracnosis, enfermedad más destructiva del cultivo de chocho (Falconí, 2012). El patógeno causal de esta enfermedad, *Colletotrichum acutatum*, es transmitido a la planta por medio de la semilla, razón por la cual la desinfección oportuna y adecuada de la semilla de chocho contribuye una medida completamente necesaria (Caicedo et al., 2001).

### **1.2.1 Causas**

- Uso de semilla de mala calidad y no certificada.
- Limitada información a los productores de tecnologías amigables con el medio ambiente.
- Escasa divulgación técnica por parte de organismos gubernamentales.

### **1.2.2 Efectos**

- Uso excesivo de agroquímicos para desinfectar la semilla
- Bajos rendimientos y bajos réditos económicos en función de lo invertido.
- Amenaza a la seguridad alimentaria, sobre todo en localidades rurales con escasos recursos las cuales podrían beneficiarse del consumo y producción de esta leguminosa.

### **1.3 Justificación**

El chocho al presentar altos contenidos de proteína, un alto valor comercial y altos rendimientos por hectárea al utilizar tecnologías apropiada es considerado un cultivo importante tanto para los consumidores como para los productores ecuatorianos (Caicedo & Peralta, 2000) & (Jacobsen, Mujica, & Ortiz, 2003) . Por tanto, surge como necesidad por parte de pequeños y medianos productores de esta leguminosa disponer semilla de alta calidad y libre de microorganismos que no afecten su calidad, posterior crecimiento, desarrollo y fructificación (Walker et al., 2011).



La práctica más utilizada por los productores de chocho ecuatoriana para la desinfección de la semilla anterior a la siembra del grano, es la exposición solar de la semilla en sacos de yute por varios días (Falconí, 2012). No existe una documentación certera que afirme desde cuándo los agricultores comenzaron con este tipo de desinfección, pero testimonios de agricultores afirman que se la viene usando por muchas generaciones, y está dando buenos resultados (Jacobsen et al., 2003). Por tanto, la radiación solar empleada por Falconí y Yáñez-Mendizábal (2017) corresponde a un rescate de tecnologías ancestrales andinas aplicada de una manera más rápida y efectiva por medio de una estufa de fabricación casera, la cual permite reportar y evaluar los resultados obtenidos al aplicar este tratamiento.

Hasta el momento se han realizado varios estudios alternativos para desinfectar la semilla de chocho, uno de estos es la radiación solar en una estufa de fabricación casera utilizando diferentes tiempos de exposición para determinar su efecto en el porcentaje de infección de la semilla con antracnosis, el desarrollo de las diferentes características agronómicas en campo (porcentaje de germinación, número de vainas por planta, número de semillas por vaina, altura de planta, índice clorofílico), e incluso un análisis económico del uso de la radiación solar frente al método químico de desinfección (Aizaga, 2015) & (Terán, 2016).

El insuficiente conocimiento del comportamiento de la semilla después de su tratamiento con radiación solar motivó a trazar los objetivos de este estudio, el cual pretendió analizar el porcentaje de proteína, la actividad enzimática de peroxidasa y proteosoma 20S en radículas y plúmulas obtenidas de semillas desinfectadas mediante radiación solar, ya que estas variables permiten determinar el grado de estrés que una semilla experimenta al ser sometida a este método de desinfección (Verma & Dubey, 2003).

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar el vigor de semilla de chocho (*Lupinus mutabilis*) pretratada con radiación solar dentro de una estufa de fabricación casera y al ambiente.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el porcentaje de humedad, contenido de proteína y porcentaje de germinación de semilla de chocho pretratada con radiación solar por 15, 30 y 45 minutos dentro de una estufa de fabricación y al ambiente.
- b) Analizar la actividad de las enzimas peroxidasa y proteosoma 20S en radículas y plúmulas obtenidas de semilla de chocho pretratada con radiación solar por 15, 30 y 45 minutos dentro de una estufa de fabricación comparado con exposición al ambiente.
- c) Determinar el tratamiento más efectivo para mantener un nivel apropiado de la actividad enzimática de las enzimas peroxidasa y proteosoma 20S que permita obtener el mayor porcentaje de germinación y mayor vigor en la semilla de chocho del genotipo I-450 Andino.

## 1.5 Hipótesis

**H0:** El uso de la radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera como pretratamiento de semilla de chocho no afectan el contenido de proteína y la actividad enzimática de peroxidasa y proteosoma 20S, favoreciendo el vigor de las semillas de chocho del genotipo I-450 Andino.

**H1:** El uso de la radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera como pretratamiento de semilla de chocho afectan el contenido de proteína y la actividad enzimática de peroxidasa y proteosoma 20S, desfavoreciendo el vigor de las semillas de chocho del genotipo I-450 Andino.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 Generalidades sobre el chocho

El chocho (*Lupinus mutabilis*) ha sido tradicionalmente considerado de gran valor nutritivo por su alto contenido de proteínas (35,5%), fibra cruda (7,6%), carbohidratos (35,7%), grasa (17.1 %), calorías (411 cal/100g), y alcaloides quinolizidínicos: lupanina y esparteína principalmente (3.5%-4.2%) los cuales no permiten su consumo directo (Jacobsen et al., 2003) & (Australian Government, 2013).

El cultivo de chocho en Ecuador se lo encuentra prácticamente en su totalidad en la región Sierra, mayoritariamente es producido por pequeños y medianos productores en las provincias de Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, Bolívar, Tungurahua, Carchi, e Imbabura (Caicedo & Peralta, 2000) & (SICA, MAGAP, & INEC, 2003)

De acuerdo con el Censo Nacional Agropecuario (2003), en Ecuador en el periodo octubre 1999-octubre 2000, se sembraron 4217 hectáreas de chocho como cultivo transitorio sin asociación y 1757 hectáreas como cultivo transitorio asociado con otro cultivo. Acumulada esta superficie de chocho sembrado, correspondió únicamente al 0,46% con respecto al total nacional de hectáreas sembradas de cultivos transitorios con y sin otros cultivos asociados.

Según el Censo Nacional Agropecuario (2003), del total de UPAs productoras de chocho, el 70% pertenecen a las provincias de Cotopaxi y Chimborazo, que combinadas corresponden al 75% de la superficie sembrada y aproximadamente el 65% de la producción nacional de este cultivo transitorio.

Peralta et al. (2012) aseguran que de las 5974 hectáreas totales presentes en el periodo octubre 1999-octubre 2000 en Ecuador, sólo 3921 hectáreas fueron cosechadas, con una

productividad promedio de 200 kg/ha. Esta baja productividad fue debido principalmente a la presencia de enfermedades y plagas, así como falta de riego (Peralta, 2016).

Hoy en día, se encuentran registros de 6270 hectáreas sembradas a nivel nacional con una productividad promedio de 400 kg/ha (INEC, 2016). Peralta et al. (2012) afirman que en Ecuador existe una superficie potencial estimada para el cultivo de chocho de 140712 hectáreas (87658 hectáreas sin limitaciones y 53054 hectáreas con limitaciones ligeras de clima y suelo).

## **2.2 Características de la variedad INIAP – 450 Andino**

El Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos del INIAP (PRONALEG-GA), a base de mejoramientos por selección de surcos triples ha desarrollado la variedad INIAP-450 ANDINO a partir de una población de germoplasma introducida de Perú en 1992 (Caicedo, Peralta, Murillo, & Rivera, 2010). La variedad INIAP-450 ANDINO es de hábito de crecimiento herbáceo y precoz. Su rendimiento es mayor en un 183%, con respecto a los ecotipos ecuatorianos. La semilla de chocho de esta variedad tiene un diámetro promedio de 8 mm, es de color crema y es de forma redonda. Las plantas de la variedad INIAP-450 ANDINO presentan una tolerancia ligera a granizadas y heladas, pero son susceptibles a plagas y enfermedades, por lo que requiere acciones preventivas con un manejo integrado de enfermedades y plagas. La época de siembra de esta variedad es recomendada en diciembre, integrando 45 kg de semilla por hectárea, con una distancia de 60 a 80 cm entre surcos y 30 cm entre sitios. Las plantas de esta variedad alcanzan una altura promedio de 140 cm y aproximadamente 20 vainas por planta. La cosecha en grano seco se consigue en un lapso de 200 días desde su siembra, obteniendo un rendimiento de 900 kg/ha. Peralta (2016) afirma que el costo de producción de 1 hectárea de chocho de la variedad INIAP-450 ANDINO es de 1363,00 USD.

### **2.3 Radiación solar**

La radiación solar corresponde a la transferencia energética por medio de ondas electromagnéticas provenientes del sol, las cuales pueden trascender a través del espacio sin necesidad de un medio material (Perpiñán, 2011). La longitud de onda y la frecuencia de las ondas electromagnéticas determinan su energía, visibilidad y poder de penetración en la superficie de la Tierra (Lacis & Hansen, 1974). El conjunto de todas las longitudes de onda se denomina espectro electromagnético y el conjunto de las longitudes de onda emitidas por el sol se denomina espectro solar (Lacis & Hansen, 1974) & (Perpiñán, 2011)

Existen algunos factores que afectan a la intensidad de la radiación solar en la superficie de la tierra, estos son: altitud, cubierta superficial, oblicuidad y latitud terrestre (Perpiñán, 2011). La radiación se puede dividir en directa o difusa dependiendo si existen nubes o factores que no permitan la llegada completa de los rayos. Gracias a la ubicación geográfica del Ecuador se dispone de una gran cantidad de días soleados, que tienen una gran intensidad de radiación directa principalmente en verano y a medio día debido a que el sol alcanza su máxima altura (Liu & Jordan, 1960). La radiación solar intensa puede afectar procesos fundamentales de organismos, en su mayoría vegetales, esta consta de 3 componentes UV: los rayos UV-B que tienen una longitud de onda de 280 y 320 nm, los rayos UV-C de 200 y 280 nm y los rayos UV-A de 330 y 400 nm. Los rayos UV-C son los más peligrosos, sin embargo, no llegan en gran cantidad a la superficie de la tierra a diferencia de los rayos UV-A (Lacis & Hansen, 1974).

### **2.4 Radiación solar en semillas**

En las últimas décadas se ha comprobado que la radiación UV-B puede alterar significativamente el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (Teramura & Sullivan,

1994). Sin embargo, la aplicación de radiación UV moderadamente, permite un ajuste que favorece a la semilla, en donde antioxidantes y peroxidasas actúan en los mecanismos de inhibición de radicales libres provocados por el estrés térmico en la radiación solar, manteniendo sus procesos bioquímicos normales y promoviendo un mejor funcionamiento de todas las estructuras proteicas de la semilla (Rogozhin, Kuriliuk, & Filippova, 2000).

La radiación solar es una alternativa ecológica para la esterilización química de algunas leguminosas, frutales, y cereales, produciendo un efecto en la reducción del crecimiento de microorganismos fúngicos nocivos para las plantas (Brown et al., 2001). Además, induce a que la semilla desarrolle mecanismos de defensa en tejido vegetal metabólicamente activo, provocando la producción de hormonas, aumento en la actividad enzimática, aumento en el contenido de clorofila, aumento en el contenido de carotenoides y aumento en el contenido de proteína (Salama, Al Watban, & Al-Fughom, 2011) & (Kacharava, Chanishvili, Badridze, Chkhubianishvili, & Janukashvili, 2009). Como consecuencia, se obtiene incrementos significativos en los rendimientos de frutos y semilla (Wilson & Heidinger, 2002).

## **2.5 Características de proteína posterior a la radiación solar**

Una de las funciones principales de las proteínas en las semillas en las plantas, corresponde en asegurar la transferencia de energía entre los complejos de las membranas tilacoides, así como del Fotosistema II (Barbato, Bergo, Szabò, Dalla Vecchia, & Giacometti, 2000). En consecuencia, cualquier situación de estrés o modificación proteica ocasionada por efecto de la radiación UV influirá en las propiedades de los pigmentos asociados, y cofactores inmiscuidos en el proceso fotosintético (Carrasco-Ríos, 2009).

Generalmente, la radiación UV-B provoca la pérdida de algunos polipéptidos y enzimas del ciclo de Calvin localizados en el fotosistema II, lo que ocasiona una oxidación no específica de aminoácidos cíclicos, produciendo un mal funcionamiento de las proteínas (Bergo et al., 2003). Adicionalmente, Teramura & Sullivan (1994) aseguran que valores anormales de exposición de semillas o material vegetal a radiación solar UV-B podría traducirse en una disrupción drástica de los mecanismos de reparación basados en la capacidad de síntesis y en la tasa de reposición de las proteínas.

Específicamente en el fotosistema II, la principal afección de la radiación UV-B es en la proteína D1, cuya disrupción establece foto inhibición parcial en las células de clorofila, dando origen a fragmentos C-terminal de 20 kDa y N-terminal de 10 kDa (Vass et al., 1996). Estos nuevos fragmentos permiten la síntesis e inserción de nuevas proteínas D1, el reciclaje de otras proteínas como la CP43 y D2 para la reconstituir la funcionalidad de los centros de reacción del fotosistema II, y, en consecuencia, la eliminación de la foto inhibición de dicha célula clorofílica. En este sentido, Salama et al. (2011) y Peykarestan & Seify (2012) afirman que la aplicación de dosis controladas de radiación UV, y en especial las de corta longitud (UV-C) aumentan el contenido total de proteína; así como el aumento de células clorofílicas, carotenoides y enzimas que permitan eliminar los radicales libres ocasionados por el estrés de la radiación solar.

## **2.6 Vigor de las semillas posterior a la radiación solar**

Durante y posterior al pretratamiento de radiación solar las semillas experimentan un estrés metabólico que ocasiona una disrupción momentánea en la fabricación de proteínas, pero gracias a este estrés, se induce a la fabricación de nuevas proteínas y aminoácidos, a un aumento de células clorofílicas, carotenoides y enzimas (Salama et al., 2011).

Peykarestan & Seify (2012) afirma que los beneficios obtenidos por la inducción del estrés térmico e hídrico ocasionado por la radiación solar no sólo contempla en el aumento de componentes anteriormente mencionados, sino también en la potencialización de dichas estructuras, es decir un mejor funcionamiento de ellas; particularidad que permite desarrollar mayor resistencia a microorganismos patógenos (Falconí & Yáñez-Mendizábal, 2017).

Neelamegam & Sutha (2015) y Wilson & Heidinger (2002) concluyen que el contenido de clorofila y el aumento de la actividad enzimática de las semillas pretratadas con radiación UV-C promueven un índice de vigor significativamente mayor que las plantas que sin tratar con este tipo de radiación, por varios factores: mayor tasa de reconstrucción y reciclaje de proteínas, incremento de la biomasa total, inducción a tolerancia a plagas y enfermedades, incremento de vainas y de semillas por vainas en leguminosas y mayor rendimiento por hectárea.

## **2.7 Características de la plúmula y radícula de la semilla de chocho**

La radícula de las semillas de chocho varía según la especie (Jacobsen & Mujica, 2006). En el caso de *Lupinus mutabilis*, su radícula presenta una raíz principal con varios pelos absorbentes a su alrededor, además presenta el desarrollo de raíces laterales que a su vez también presentan pelos absorbentes (Walker et al., 2011).

*Lupinus mutabilis* puede presentar una radícula de hasta 4 centímetros de largo con un diámetro aproximado de 50 mm. En radículas superiores a los 30 días de desarrollo es normal ver la presencia de nódulos de *Bradyrhizobium*, los cuales fijarán nitrógeno en fases de crecimiento (Australian Government, 2013). Peralta (2016) sostiene que la morfología de las radículas y las raíces reflejan diferencias en la adaptación a los diferentes tipos de suelo en los que esta especie puede adaptarse.



*Lupinus mutabilis* presenta la característica de tener plúmulas palmeadas con pequeñas hojas cotiledonares en forma de cuchillas dividido en número de 4 o 5. La forma característica de las hojas cotiledonares de las semillas de *Lupinus mutabilis* es ovalada y oblonga, aovada y calceolada.

La superficie de las plúmulas suele presentar pelos de color plateado. Las hojas cotiledonares son color verde claro o verde plateado y están conectadas a la semilla por pequeños peciolos que varían de 2 a 3 cm de longitud (Jacobsen & Mujica, 2006) & (Walker et al., 2011).

## **2.8 Enzima Peroxidasa**

La peroxidasa es una enzima que tienen como función principal catalizar la oxidación a expensas del peróxido de hidrógeno. Las peroxidases de los vegetales son complejos monoméricos que intervienen en varios procesos dentro del metabolismo vegetal, entre las principales están: lignificación, la suberización, el metabolismo de las auxinas, el ensamblado de las proteínas de la pared celular, la tolerancia a sales, balance del estrés hídrico y la defensa contra el ataque de patógenos (Van Loon et al., 2006) citado por (Ezziyyani, Requena, & Candela, 2005). Comúnmente, las peroxidases se las puede evidenciar en una planta cuando los tejidos vegetales sufren una infección por patógenos, pues como se mencionó anteriormente, entre sus labores están la lignificación, la suberización o la insolubilización de los monómeros de la extensina, cuyos procesos, catalogados como integrantes de la respuesta defensiva de la planta frente al ataque de patógenos (Cuervo, Martínez, Ardila, & Higuera, 2009) & (Herrero, 2014). En el caso de semillas o granos, la peroxidasa actúa específicamente en la eliminación de radicales libres, en el balance hídrico de la semilla y en el normal ensamblaje de proteínas posterior a cualquier tipo de estrés (Salama et al., 2011).

## 2.9 Enzima Proteosoma 20S

La enzima proteosoma, es un complejo de 2.5 MDa que se localiza en el núcleo y el citoplasma de todas las células eucariontes. El complejo proteosoma está compuesto por dos subcomplejos: una partícula central 20S (CP) en donde se lleva a cabo la proteólisis, y una partícula reguladora 19S (RP) que prepara al sustrato para ser internado y degradado en la CP (Üstün et al., 2016). El complejo proteosoma actúa como responsable de la degradación de proteínas encargadas de varios procesos biológicos en las plantas. Precedentemente a la degradación de proteínas por los complejos proteosoma, las proteínas son modificadas covalentemente por una cadena de poliubiquitina (Rocha-sosa, 2013). La ubiquitinación es producida en tres pasos, los cuales necesitan de una enzima activadora, una enzima conjugadora y una ligasa de Ub. La mayoría de las proteínas marcadas por ubiquitinación serán degradadas por el complejo de proteosoma (Smalle et al., 2002). Smalle et al. (2002) y (Kurepa et al. (2009) afirman que adicionalmente a la función principal de reconocer y degradar proteínas poliubiquitinizadas, el complejo proteosoma puede asimismo degradar proteínas que no fueron modificadas por la poliubiquitinación (Üstün et al., 2016). Actualmente se conoce la función de sólo dos RP dentro del complejo proteosoma, el RPN13 que permite la separación de cadenas de poliubiquitinas, y el RPN10 que ayuda en el reconocimiento de proteínas poliubiquitinizadas antes de la digestión (Rocha-sosa, 2013). El Sistema ubiquitina-proteosoma es uno de los principales sistemas de degradación de proteínas en células eucariotas, el cual no sólo remueve proteínas defectuosas y malformadas, sino que además controla varios procesos celulares a través de la eliminación de proteínas reguladoras de vida corta, reparación de ADN y señalización de procesos de transducción para responder ante situaciones adversas como puede ser una baja disponibilidad de agua o el ataque de patógenos (Vierstra, 2009) citado por (Kurepa et al., 2009).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación del lugar de la investigación**

La fase experimental como la fase de laboratorio de la investigación se desarrolló en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

##### **3.1.1 Ubicación Política**

Provincia: Pichincha

Cantón: Rumiñahui

Parroquia: San Fernando

Lugar: Laboratorios de Fitopatología, Hacienda El Prado – IASA 1

##### **3.1.2 Ubicación geográfica**

Altitud: 2723 msnm

Latitud: 0°23'2.94"S

Longitud: 78°24'54.11"O

##### **3.1.3 Ubicación ecológica**

Temperatura promedio: 14 °C

Temperatura máxima: 22,06 °C

Temperatura mínima: 8,08 °C

Precipitación anual: 1200 mm

Humedad relativa: 68%

Zona Ecológica: Bosque Húmedo



**Figura 1** Fotografía Hacienda el Prado – IASA I

(Lugar de investigación)

Fuente: Google Maps, 2018

## **3.2 Diseño Experimental**

### **3.2.1 Factores**

Los factores que se tomaron en cuenta en esta investigación fueron:

- a) Los tiempos de exposición a radiación solar (15, 30 y 45 minutos)
- b) La manera de radiación (dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente)

### **3.2.2 Tratamientos a comparar**

Se evaluaron 6 tratamientos con 3 repeticiones, correspondientes a cada uno de los tiempos de solarización y manera de radiación, aplicados en las semillas de chocho del genotipo INIAP-450 ANDINO.

**Tabla 1**

*Tratamientos aplicados a semilla de chocho del genotipo INIAP-450 ANDINO para su evaluación enzimática.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Detalle</b>
<b>T0 - Control</b>	Semilla con 0 minutos de radiación
<b>T1</b>	Semilla expuesta a 15 minutos de radiación dentro de la estufa de fabricación casera
<b>T2</b>	Semilla expuesta a 30 minutos de radiación dentro de la estufa de fabricación casera
<b>T3</b>	Semilla expuesta a 45 minutos de radiación dentro de la estufa de fabricación casera
<b>T4</b>	Semilla expuesta a 15 minutos de radiación al ambiente (fuera de la estufa de fabricación casera)
<b>T5</b>	Semilla expuesta a 30 minutos de radiación al ambiente (fuera de la estufa de fabricación casera)
<b>T6</b>	Semilla expuesta a 45 minutos de radiación al ambiente (fuera de la estufa de fabricación casera)

### **3.2.2 Estructura de parcelas**

Diseño completamente al azar (DCA).

### **3.2.3 Estructura de tratamientos**

Bifactorial ( $3 \times 2 + 1$ ) con 3 repeticiones.

### **3.2.4 Unidad experimental**

Semillas de chocho del genotipo INIAP 450 – ANDINO

### **3.2.5 Características de la unidad experimental**

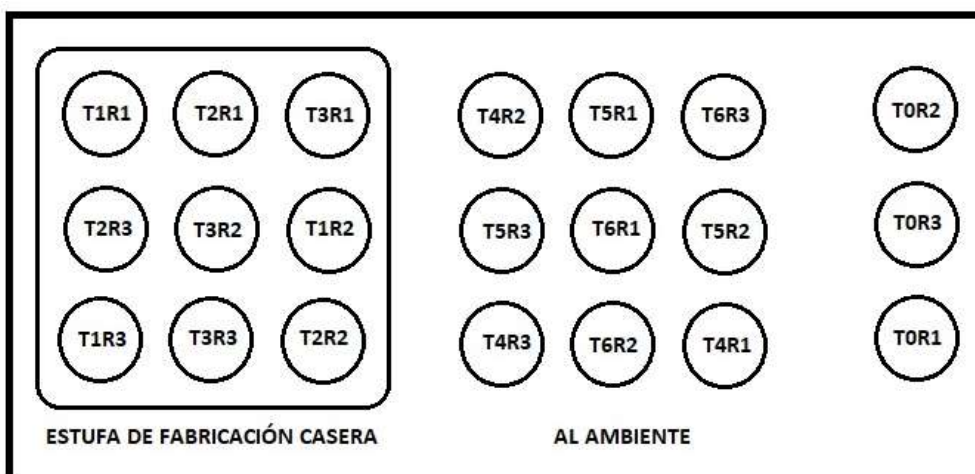
Las unidades experimentales las características detalladas en la siguiente tabla:

**Tabla 2**  
*Características de las unidades experimentales*

Parámetro	Detalle
Número de unidades experimentales	21 unidades experimentales
Forma de las unidades experimentales	Cajas petri de plástico
Cantidad de semilla por caja petri	Aproximadamente 10 gramos de semilla de chocho de genotipo INIAP-450 ANDINO

### 3.2.6 Croquis del experimento

El experimento se dispuso de la siguiente manera para efectuar la radiación según el tipo de tratamiento a aplicar.



*Figura 2* Croquis experimental del ensayo

### 3.2.7 Unidades muestrales

Las variables de respuesta se las pudo medir en las siguientes estructuras anatómicas de las plantas de chocho provenientes de semilla pretratada por radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente (fuera de la estufa de fabricación casera): radículas y plúmulas.

### 3.2.8 Variables de estudio

#### 3.2.8.1 Variables independientes

- Los tiempos de exposición a radiación solar (15, 30 y 45 minutos).

- La manera de radiación (dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente).

### **3.2.8.2 Variables dependientes**

- Radiación acumulada
- Contenido de humedad
- Porcentaje de germinación
- Contenido de proteína
- Actividad enzimática de peroxidasa
- Actividad enzimática de proteosoma 20S

### **3.2.8.3 Comparación de medias**

En las variables de respuesta, si se encontraba diferencias significativas entre tratamientos se procedió a comparar las medias por medio de una prueba de comparación de medias inexacta, el contraste de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD), con una significancia del 5%.

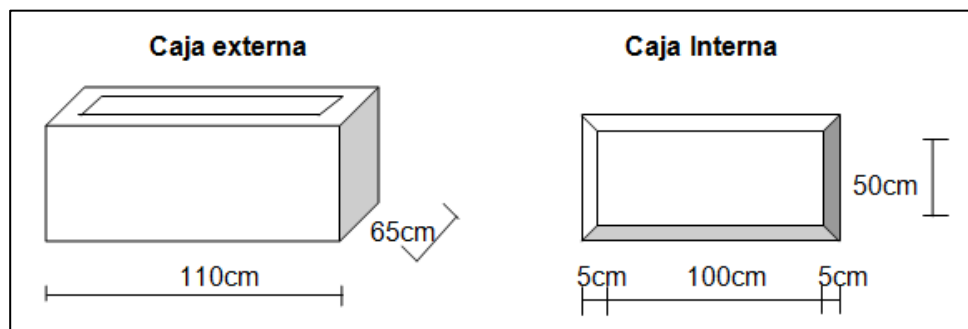
## **3.3 Radiación Solar**

### **3.3.1 Materiales para realizar la radiación solar en semillas**

Se utilizaron los siguientes materiales para efectuar la radiación solar en las semillas de chocho:

- Cajas petri de plástico
- Estufa de fabricación casera
- Piranómetro con data logger
- Termómetro de alta temperatura con data logger
- Bandejas plásticas
- Semilla de chocho del genotipo I-450 Andino

- Computadora portátil



**Figura 3** Diagrama de la estufa de fabricación casera diseñada por C. Falconí.

Fuente: (Falconí, 2012)

La estufa de fabricación casera tiene las siguientes dimensiones: 110 x 65 cm el área total, 100 x 50 cm la parte interna y 15 cm la altura de la caja interna (Estufa diseñada por Dr. Cesar Falconí Saá)

### 3.3.2 Funcionamiento de la estufa de fabricación casera

La estufa de fabricación casera consiste en una caja de cartón hueca recubierta en sus paredes interiores laterales por láminas de aluminio resplandeciente que funcionan como espejos. En su parte superior, en donde se encuentra el orificio, presenta una tapa de polietileno para invernaderos. La estufa de fabricación casera ejerce su trabajo en un día completamente soleado y sin nubosidad, ya que de esta manera los rayos solares UV podrán llegar sin difusión hacia las semillas que se encuentran dentro de la cámara. La función principal de la cubierta de polietileno es la de filtrar los rayos UV, puesto que éste tipo de material solo permite el ingreso de los rayos UV tipo C, los cuales poseen características benéficas para la desinfección de semilla. La función secundaria de la cubierta de polietileno es conservar la temperatura almacenada en la estufa de fabricación casera durante el tiempo de exposición. El efecto de los rayos UV tipo C inducidos por el sol van a generar un aumento significativo dentro de la estufa a comparación de la temperatura al exterior.



En definitiva, la acción conjunta de la presencia de una temperatura considerablemente elevada con respecto al ambiente exterior y la presencia de la radiación acumulada por los rayos UV tipo C dentro de la estufa de fabricación casera, hacen de ésta un artefacto válido para el pretratamiento de semilla de chocho por radiación solar.

### **3.3.3 Metodología para inducir la radiación solar en semillas**

Se siguieron los siguientes pasos y consideraciones:

- a) La radiación se efectuó en un día completamente soleado y sin nubes.
- b) Se colocó las cajas petri con la semilla de chocho de los tratamientos 1, 2 y 3 dentro de la estufa de fabricación casera.
- c) Se colocó el data logger del piranómetro y del termómetro de alta temperatura dentro de la estufa de fabricación casera; y se la procedió a cerrarla con su tapa de plástico transparente.
- d) Se procedió a retirar las cajas petri de la estufa de fabricación casera transcurrido el tiempo de cada tratamiento.
- e) Terminada la radiación de los tratamientos dentro de la estufa de fabricación casera se procedió a realizar la ubicación de las cajas petri con los tratamientos de radiación al ambiente sobre las bandejas plásticas junto con los data logger del piranómetro y del termómetro de alta temperatura.
- f) Se procedió a retirar las cajas petri de las bandejas plásticas transcurrido el tiempo de cada tratamiento.
- g) Se grabó las radiaciones acumuladas y las temperaturas alcanzadas por los tratamientos en la computadora portátil.

### **3.4 Determinación de Humedad**

#### **3.4.1 Materiales para la determinación de humedad en las semillas**

Se utilizaron los siguientes materiales y equipos para la determinación de humedad en las semillas pretratadas por radiación solar:

- Estufa de fabricación casera
- Balanza analítica
- Cajas petri de vidrio

#### **3.4.2 Metodología para la determinación de humedad en las semillas**

Se empleó el método gravimétrico de la estufa sugerido por la FAO (2013) para obtener el porcentaje de humedad de las semillas. Consistió en los siguientes pasos:

- Pesar tres repeticiones de 10 gramos de semilla correspondiente a cada tratamiento en la balanza analítica.
- Posteriormente se sometió a radiación solar a cada grupo de semillas por tratamiento.
- Transcurrida la radiación solar se volvió a pesar las semillas.
- Se registró los datos obtenidos para su posterior análisis.

Según la FAO (2013), el cálculo del porcentaje de humedad se lo obtiene aplicando la siguiente formula.

$$\textit{Contenido de humedad} (\%) = [(\text{Peso inicial} - \text{Peso tras radiación}) / \text{Peso inicial}] \times 100$$

### **3.5 Obtención radículas**

#### **3.5.1 Materiales para la obtención de radículas**

Se usaron los siguientes materiales, reactivos y equipos:

- Semilla de chocho pretratada con radiación solar de cada tratamiento.

- Cajas petri de plástico
- Incubadora
- Alcohol al 70%
- Cloro al 1%
- Agua destilada
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Agar papa dextrosa
- Balanza analítica
- Frasco térmico autoclavable
- Parafilm
- Criocongeladora
- Tubos Falcon
- Liofilizadora
- Mortero

### **3.5.2 Metodología para la obtención de radículas**

Se procedió de la siguiente manera:

- Se pesó 10 gramos de agar papa dextrosa en la balanza analítica
- Se incorporó los 10 gramos de agar papa dextrosa en el frasco térmico con 1 litro de agua destilada
- Se autoclavó el frasco por 15 minutos cuando éste alcance 120 °C.
- Se dejó enfriar el medio de agar papa dextrosa.

- Se limpió 21 cajas petri de plástico y limpiarlas con alcohol.
- Se dispensó el medio de agar en las cajas petri dentro de la cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol y por luz UV.
- Se dejó enfriar el medio en las cajas hasta que tenga una consistencia semisólida.
- Se seleccionó 30 semillas por tratamiento.
- Se sometió las semillas a una desinfección líquida, sumergiéndolas en cloro al 1% por 3 minutos, seguido por una sumersión en alcohol al 70% igualmente por 3 minutos, y finalmente se enjuagó con agua destilada.
- Una vez desinfectadas las semillas, se colocó 10 semilla por caja petri en la cámara de flujo de laminar.
- A todas las cajas se las cerró con parafilm y se las ingresó en la incubadora a una temperatura de 30°C.
- Pasados 10 días, se procedió a abrir las cajas petri y a coleccionar las radículas en tubos falcon.
- Se criocongeló las muestras coleccionadas a 80°C bajo cero por dos días.
- Se liofilizaron todas las muestras por dos días.
- Se procedió a triturar las muestras completamente en un mortero y se almacenó las muestras en los mismos tubos Falcon.
- Se almacenó los tubos Falcon en la refrigeradora.

### **3.6 Obtención de plúmulas**

#### **3.6.1 Materiales para la obtención de plúmulas**

Se usaron los siguientes equipos y materiales:

- Semilla de chocho pretratada con radiación solar de cada tratamiento.
- Alcohol al 70%
- Cloro al 1%
- Agua destilada
- Almacigos de 50 huecos
- Sustrato de siembra (suelo agrícola, arena y material orgánico)
- Incubadora de plántulas.
- Parafilm
- Criocongeladora
- Tubos Falcon
- Liofilizadora
- Mortero

### **3.6.2 Metodología para la obtención de plúmulas**

Se procedió de la siguiente manera:

- Se llenaron los almacigos con el sustrato de siembra y se los humedeció hasta llegar a capacidad de campo.
- Se seleccionó 75 semillas por tratamiento.
- Se sometió las semillas a una desinfección líquida, sumergiéndolas en cloro al 1% por 3 minutos, seguido por una sumersión en alcohol al 70% igualmente por 3 minutos, y finalmente se enjuagó con agua destilada.
- Una vez desinfectadas las semillas, se colocó 3 semillas de cada tratamiento en cada uno de los huecos de los almacigos.

- Se ingresó los almácigos dentro de la incubadora de plántulas, programándola con una humedad relativa del 80% y 75% de luminosidad.
- Se regó las plantas pasando un día.
- Transcurridos 21 días, se procedió a colectar las plúmulas de cada una de las plántulas pertenecientes a cada tratamiento.
- Se criocongeló las muestras colectadas a 80°C bajo cero por dos días.
- Se liofilizó todas las muestras por dos días.
- Se procedió a triturar las muestras completamente en un mortero y se almacenó las muestras en los mismos tubos Falcon.
- Se almacenó los tubos Falcon en la refrigeradora.

### **3.7 Obtención extractos líquidos puros**

#### **3.7.1 Materiales para la obtención de extractos líquidos puros**

Se usó los siguientes materiales e insumos:

- Radículas y plúmulas liofilizadas y trituradas obtenidas de las semillas pretratadas por cada tratamiento.
- Solución tampón fosfato salino o PBS, que contiene (100 mL de ácido clorhídrico 1M, 100 mL de hidróxido de Sodio 10M y 800 mL de agua destilada).
- Vortex
- Tubos de ensayo
- Centrifugadora
- Tubos Eppendorf
- Micropipetas

### **3.7.2 Metodología para la obtención de extractos líquidos puros**

Se siguieron los siguientes pasos:

- Se pesó 0,3 gramos de material liofilizado y triturado de la muestra de cada tratamiento y se lo colocó en tubos de ensayo de 10 mL.
- Se hidrató el material pesado con 2,7 mL de PBS.
- Se centrifugó a 20000 rpm por 15 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante de cada tubo de ensayo y se lo aforó en tubos Eppendorf hasta llegar a 1,5 mL.
- Se almacenaron los extractos puros en la criocongeladora a 80°C bajo cero, hasta ser utilizados en las siguientes pruebas de proteína y de actividad enzimática.

### **3.8 Determinación del porcentaje de germinación**

#### **3.8.1 Materiales para la determinación del porcentaje de germinación**

Se usaron los mismos materiales y equipos que los usados para la obtención de radículas.

#### **3.8.2 Metodología para la determinación del porcentaje de germinación**

Se procedió de la misma manera que se procedió para la obtención de radículas. Se contabilizaron las semillas germinadas en cada caja petri perteneciente a cada tratamiento.

### **3.9 Determinación del contenido de proteína**

#### **3.9.1 Materiales para la determinación del contenido de proteína**

Se utilizó los siguientes materiales, equipos y reactivos:

- Extracto líquido puro de la muestra perteneciente a cada tratamiento.
- Kit BCA para determinación de proteína – Pierce BCA Assay Kit from Thermo scientific

- Solución tampón fosfato salino o PBS, que contiene (100 mL de ácido clorhídrico 1M, 100 mL de hidróxido de Sodio 10M y 800 mL de agua destilada).
- Espectrofotómetro
- Tubos de ensayo
- Vortex
- Placas de medición para espectrofotometría.
- Micropipetas

### 3.9.2 Metodología para la determinación del contenido de proteína

#### 3.9.2.1 Preparación de la curva de calibración

- Se diluyó el contenido de 1 ampolla de albúmina estándar (BSA) y PBS en tubos Eppendorf para la creación de estándares de la siguiente manera:

**Tabla 3**

*Preparación de la curva estándar para la determinación de proteína por espectrofotometría*

<b>Estándares</b>	<b>Volumen de PBS (μL)</b>	<b>Volumen de BSA (μL)</b>	<b>Concentración de BSA final (μg/mL)</b>
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 de la dilución del tubo B	750
E	325	325 de la dilución del tubo C	500
F	325	325 de la dilución del tubo E	250
G	325	325 de la dilución del tubo F	125
H	400	100 de la dilución del tubo G	25
I	400	0	0 = Blanco

Fuente: (Thermo Scientific, 2007)



- Con la ayuda de una micropipeta se colocó las diluciones para la curva estándar en la primera hilera de pocillos de la placa.

### 3.9.2.2 Preparación del reactivo de trabajo

- Se usó la siguiente fórmula para conseguir el volumen total del Reactivo de Trabajo (RT):

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ muestras}) \times (\# \text{ réplicas}) \times 0,2 \text{ mL (volumen de RT por muestra)} = \text{Volumen RT}$$

Reemplazando por los valores de esta medición, se tuvo:

$$(9 + 7) \times (3 \text{ réplicas}) \times 0,2 \text{ mL} = 9,6 \approx 10 \text{ mL de Reactivo de trabajo}$$

- Se preparó el reactivo de trabajo, mezclando 50 partes del Reactivo A con 1 parte del reactivo B, por lo que se usó 10 mL de reactivo A y 0,2 mL de reactivo B para conseguir 10 mL de reactivo de trabajo.

### 3.9.2.3 Llenado de placa e incubación

- Se colocó 0,2 mL del reactivo de trabajo en cada uno de los pocillos de la placa, incluyendo los de la curva estándar.
- Se pipeteó 0,1 mL del extracto puro de cada tratamiento en triplicados dentro de cada pocillo de la placa.
- Se incubó la placa a 37°C por 30 minutos dentro de una incubadora.
- Transcurridos los 30 minutos, se corrió la placa en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 562 nm.

### 3.9.2.4 Cálculo del contenido de Proteína

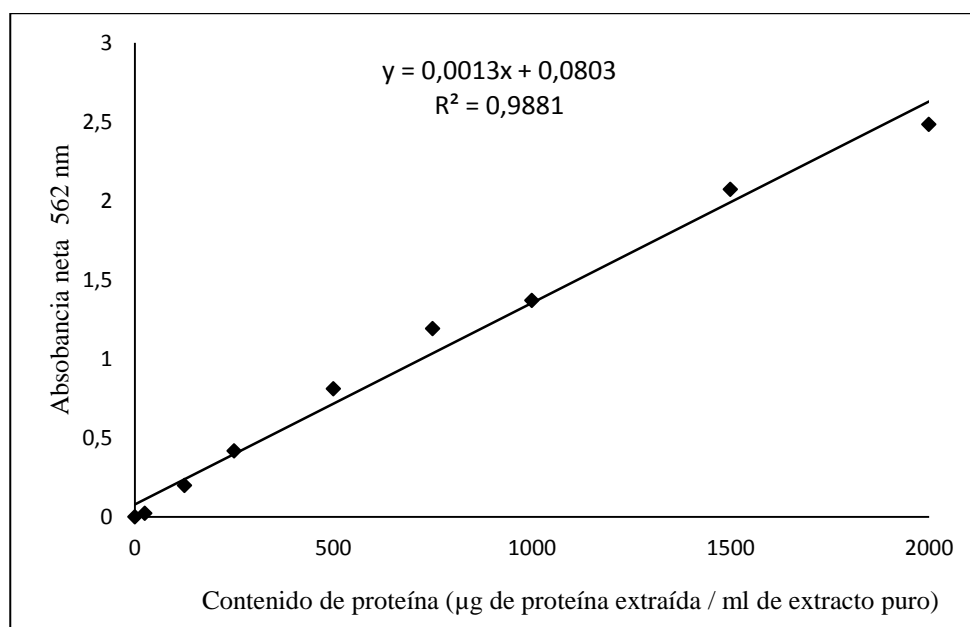
- Primeramente, se tabuló las absorbancias obtenidas de cada estándar preparado.

**Tabla 4**

*Absorbancias de los estándares para la curva de calibración en la cuantificación del contenido de proteína*

Estándares preparados	Contenido de proteína ( $\mu\text{g}$ de proteína extraída / ml de extracto puro)	Absorbancias
I	0 = Blanco	0
H	25	0,022
G	125	0,198
F	250	0,416
E	500	0,81
D	750	1,19
C	1000	1,369
B	1500	2,07
A	2000	2,482

1. Se graficó en Excel la relación existente entre el contenido de proteína de cada estándar con su absorbancia, en donde se obtuvo la ecuación que explicaba la relación entre variables.



**Figura 4** Curva de calibración para el contenido de proteína

- De la ecuación obtenida en el gráfico de la relación entre la concentración ( $\mu\text{g}$  de proteína extraída / ml de extracto puro) con respecto a sus absorbancias ( $y = 0,0013x + 0,0803$ ), podemos deducir lo siguiente:

$$\text{Absorbancia medida} = 0,0013 \text{ contenido de proteína } (\mu\text{g de proteína extraída / ml de extracto puro}) + 0,0803$$

Al despejar  $x$ , tenemos:

$$\text{Contenido de proteína } \left( \frac{\mu\text{g de proteína extraída}}{\text{ml de extracto puro}} \right) = \frac{\text{Absorbancia medida} - 0,0803}{0,013}$$

- Convertimos el resultado a mg de proteína extraída / mg de material vegetal seco, de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \text{Contenido de proteína } \left( \frac{\text{mg de proteína extraída}}{\text{mg de material vegetal seco}} \right) \\ &= \left( \frac{\mu\text{g de proteína extraída}}{\text{ml de extracto puro}} \right) \times \left( \frac{2,7 \text{ mL de diluyente}}{0,3 \text{ g de material seco}} \right) \times \left( \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \end{aligned}$$

### 3.10 Determinación de la actividad de peroxidasa

#### 3.10.1 Materiales para la determinación de la actividad de peroxidasa

Se utilizaron los siguientes materiales, insumos y equipos:

- Extracto líquido puro de la muestra perteneciente a cada tratamiento.
- Kit de determinación de peroxidasa – Invitrogen from Thermo scientific
- Solución tampón fosfato salino o PBS, que contiene (100 mL de ácido clorhídrico 1M, 100 mL de hidróxido de Sodio 10M y 800 mL de agua destilada).
- Tubos de ensayo
- Espectrofotómetro
- Placas de medición para espectrofotometría.

- Micropipetas

### **3.10.2 Metodología para la determinación de la actividad de peroxidasa**

#### **3.10.2.1 Preparación de soluciones madre**

- En un tubo de ensayo, se disolvió todo el contenido sólido del reactivo A (reactivo rojo) en 60  $\mu\text{L}$  del reactivo B (dimetilsulfóxido), esta nueva solución se la llamó reactivo rojo activado, la cual presentaba una concentración de 10mM.
- Se añadió 4 mL del reactivo C (Solución tampón 5X) a 16 mL de agua deionizada dentro de un tubo de ensayo. La nueva solución preparada con 20 mL tenía una concentración de la solución tampón de 1X.
- Se diluyó todo el contenido líquido de 1 ampolla del reactivo D (peroxidasa de rábano picante) en 1 mL de la solución tampón 1X preparada en el paso anterior, a esta nueva solución se la llamó peroxidasa activada cuya concentración es de 2 mU/mL.
- Se diluyó 22,7  $\mu\text{L}$  del contenido líquido del reactivo E (peróxido de hidrogeno al 3%) en 977  $\mu\text{L}$  de la solución tampón 1X, esta nueva solución generada se la consideró como la solución de trabajo 1.
- En un tubo de ensayo, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de la solución reactivo rojo activado, 500  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo 1 y 4.45 mL de la solución tampón 1X; esta nueva solución con 5 mL de volumen total, se la llamó solución de trabajo final, la cual presentaba una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de reactivo rojo y 2mM de peróxido de hidrógeno.

#### **3.10.2.2 Preparación de una curva de calibración**

Se preparó 6 concentraciones diluyendo 50  $\mu\text{L}$  de peroxidasa activada 5 veces en PBS.

**Tabla 5**

*Preparación de curva de calibración para la medición de la actividad de peroxidasa*

<b>Estándar</b>	<b>Volumen peroxidasa activada (μL)</b>	<b>Volumen de PBS como diluyente (μL)</b>	<b>Concentración final de peroxidasa (mU/mL)</b>
<b>A</b>	50	0	2,0
<b>B</b>	40	10	1,6
<b>C</b>	30	20	1,2
<b>D</b>	20	30	0,8
<b>E</b>	10	40	0,4
<b>F</b>	0	50	0

Fuente: (Invitrogen, 2009)

### **3.10.2.3 Llenado de placa e incubación**

- Se colocó 50 μL de los estándares creados anteriormente en los primeros seis pocillos de la placa de medición.
- Se colocó 50 μL de los extractos líquidos puros de cada uno de los tratamientos en los siguientes pocillos a los estándares en triplicados.
- Se añadió 50 μL de la solución de trabajo final a cada uno de los pocillos con los estándares y los extractos líquidos puros de cada tratamiento.
- Se incubó la placa a 37°C por 30 minutos dentro de una incubadora.
- Transcurridos los 30 minutos, se corrió la placa en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 530-560 nm.

### **3.10.2.4 Cálculo de la actividad enzimática de peroxidasa**

- Primeramente, se tabuló las absorbancias obtenidas de cada estándar y muestra.
- Se procedió a retabular las absorbancias de cada muestra corregidas por el blanco y los estándares preparados.

- Se ocupó un coeficiente de extinción,  $6580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  probado en evaluaciones enzimáticas de chocho en anteriores estudios realizados en evaluaciones enzimáticas de chocho (Falconí & Yáñez-Mendizábal, 2017).
- Se ocupó la siguiente fórmula para cuantificar la actividad enzimática de peroxidasa:

$$\text{Cuantificación de peroxidasa} \left( \frac{\text{mU}}{\text{g de materia seca}} \right) = \text{Absorbancia medida} * 6580$$

### 3.11 Determinación de la actividad de proteosoma 20S

#### 3.11.1 Materiales para la determinación de la actividad de proteosoma 20S

Se usaron los siguientes materiales, insumos y equipos:

- Extracto líquido puro de la muestra perteneciente a cada tratamiento.
- Kit de determinación de proteosoma 20S – Proteosome 20S Assay Kit from Sigma.
- Solución tampón fosfato salino o PBS, que contiene (100 mL de ácido clorhídrico 1M, 100 mL de hidróxido de Sodio 10M y 800 mL de agua destilada).
- Espectrofotómetro de fluorescencia
- Vortex
- Tubos de ensayo
- Placas de medición para espectrofotometría.
- Micropipetas

#### 3.11.2 Metodología para la determinación de la actividad de proteosoma 20S

##### 3.11.2.1 Preparación soluciones de carga

- Se colocó 25  $\mu\text{L}$  del reactivo C (dimetilsulfóxido) dentro de la ampolla del reactivo A (Sustrato concentrado de proteosoma LLVY-R110), y se mezcló bien en el vortex, a esta nueva solución se la llamó proteosoma activada.

- En un tubo de ensayo, se añadió 25  $\mu\text{L}$  de proteosoma activada y 10 mL del reactivo B (solución tampón), y se mezcló en el vortex, a esta nueva solución se la llamó solución de carga.

### 3.11.2.2 Llenado de placa e incubación

- Se colocó 10  $\mu\text{L}$  de cada extracto líquido puro en duplicados en la placa de medición, excepto en los dos primeros pocillos, los cuales sirvieron como blanco.
- Se colocó 100  $\mu\text{L}$  de la solución de carga en cada uno de los pocillos donde en donde se encontraban los blancos y el material líquido con el extracto puro de cada tratamiento.
- Se incubó la placa en una incubadora por 60 minutos a 37 °C.
- Transcurridos los 60 minutos, se corrió la placa en el espectrofotómetro de fluorescencia con una longitud de onda de 490-525 nm.

### 3.11.2.3 Cálculo de la actividad enzimática de proteosoma 20S

- Primeramente, se tabuló las absorbancias obtenidas de cada estándar y muestra.
- Se procedió a retabular las absorbancias de cada muestra corregidas por el blanco y los estándares preparados.
- Se ocupó un coeficiente de extinción, 1440  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  probado en evaluaciones enzimáticas de chocho en anteriores estudios realizados en evaluaciones enzimáticas de chocho (Whitby et al., 2000).
- Se ocupó la siguiente fórmula para cuantificar la actividad enzimática de peroxidasa:

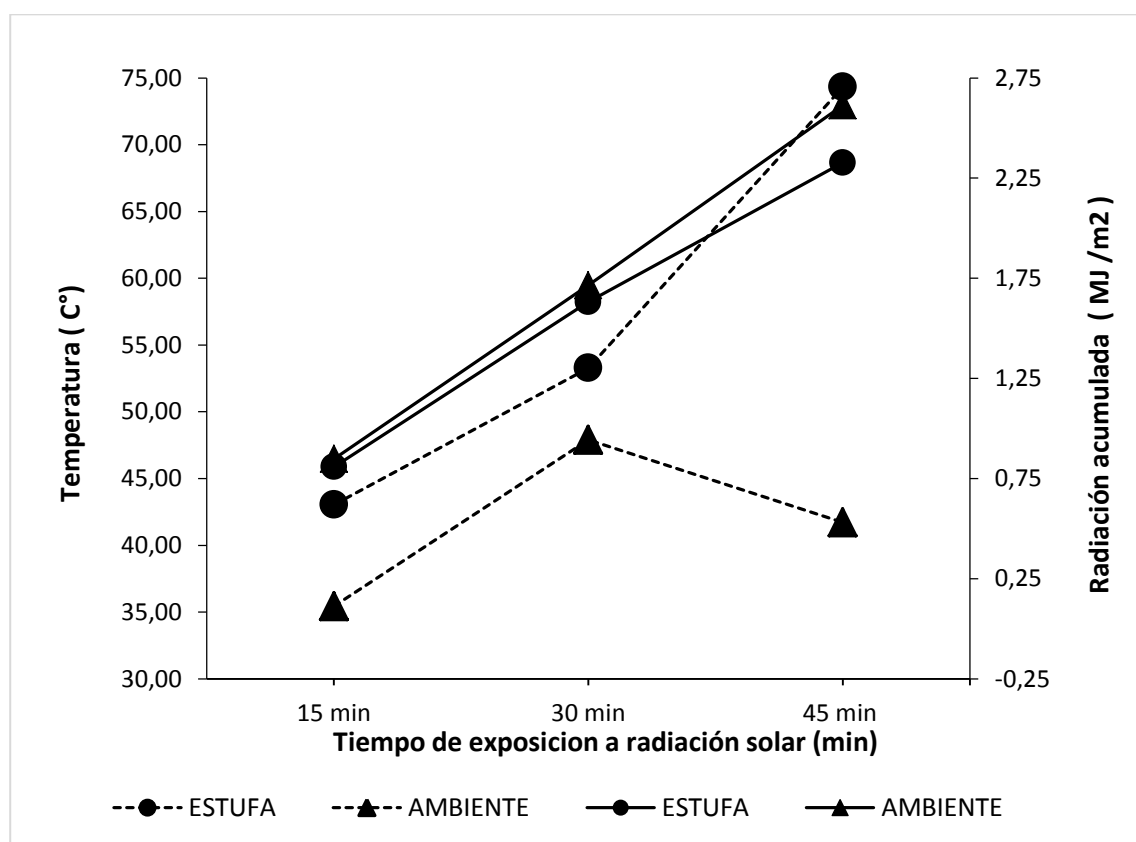
$$\text{Cuantificación de proteosoma 20S} \left( \frac{\text{mU}}{\text{g de materia seca}} \right) = \text{Absorbancia medida} * 1440$$

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Radiación solar acumulada

En la figura 5, se puede observar la radiación solar acumulada la cual está expresada en ( $\text{MJ}/\text{m}^2$ ) y la temperatura media en ( $^{\circ}\text{C}$ ). Dichas variables fueron obtenidas por medio de los data logger del piranómetro y del termómetro de alta temperatura respectivamente. Se graficó la tendencia que llevó la radiación acumulada y la temperatura al pretratar la semilla del genotipo INIAP-450 ANDINO por 15, 30 y 45 minutos dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente.



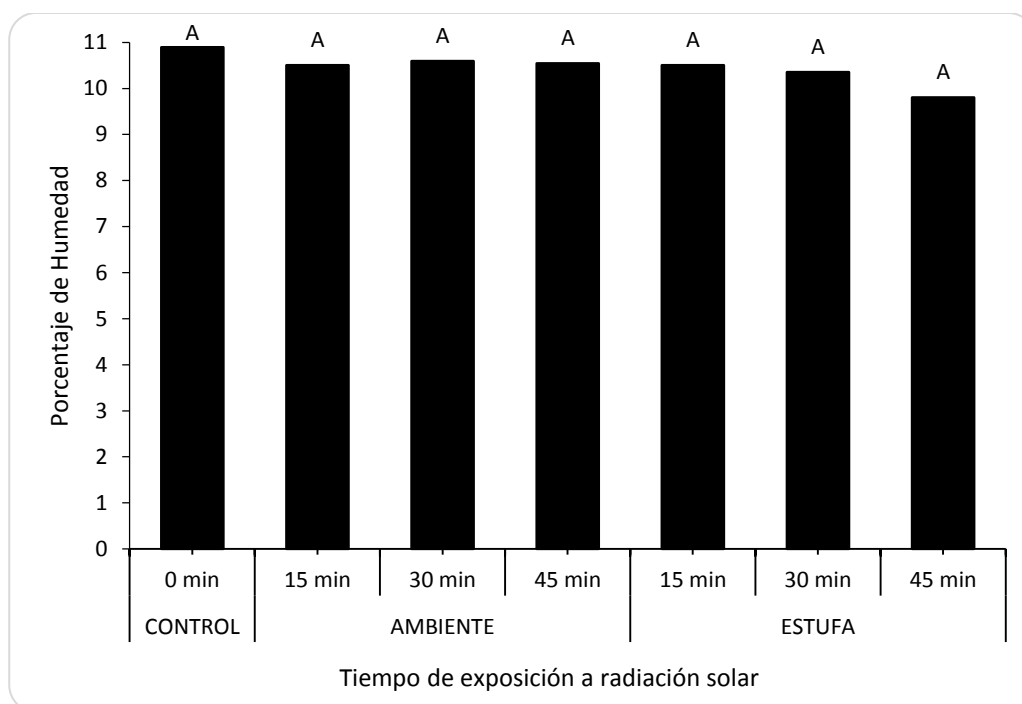
**Figura 5** Radiación solar acumulada y temperatura alcanzada dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente



La radiación acumulada alcanzada a los 15 minutos de exposición en la estufa de fabricación casera fue de 2,33 (MJ/m<sup>2</sup>) y una temperatura de 74,33 °C, mientras que por 15 minutos de exposición al ambiente se alcanzó una radiación acumulada de 2,61 (MJ/m<sup>2</sup>) y una temperatura de 61,7 °C. En resumen, al realizar el pretratamiento de exposición a radiación solar, la mayor temperatura se obtiene dentro de la estufa de fabricación casera y la mayor radiación se obtiene al ambiente.

#### 4.2 Contenido de Humedad

El contenido de humedad de la semilla de chocho perteneciente a cada uno de los tratamientos establecidos posterior al pretratamiento con radiación solar, se representó en la siguiente figura.



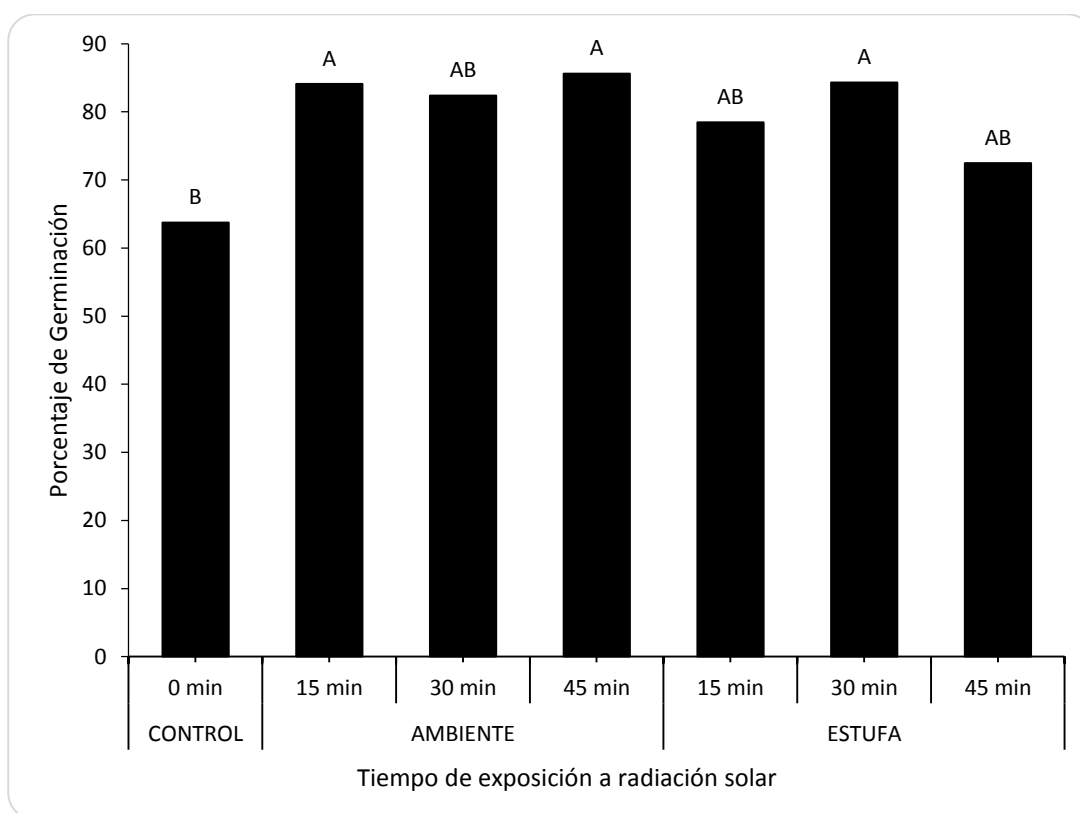
**Figura 6** Porcentaje de Humedad de la semilla de chocho INIAP-450

ANDINO posterior a la radiación solar.

Como se puede apreciar en la figura 6, las semillas de chocho pertenecientes a cada uno de los diferentes tratamientos, tanto dentro de la estufa de fabricación casera, al ambiente y su control sin exposición a radiación solar, no presentan una diferencia significativa en el contenido de humedad entre ellos. El contenido de humedad no se ve afectado de ninguna manera a los 15, 30 y 45 minutos de exposición a radiación solar.

### 4.3 Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación de la semilla de chocho perteneciente a cada uno de los tratamientos establecidos posterior al pretratamiento con radiación solar, se representó en la siguiente figura.

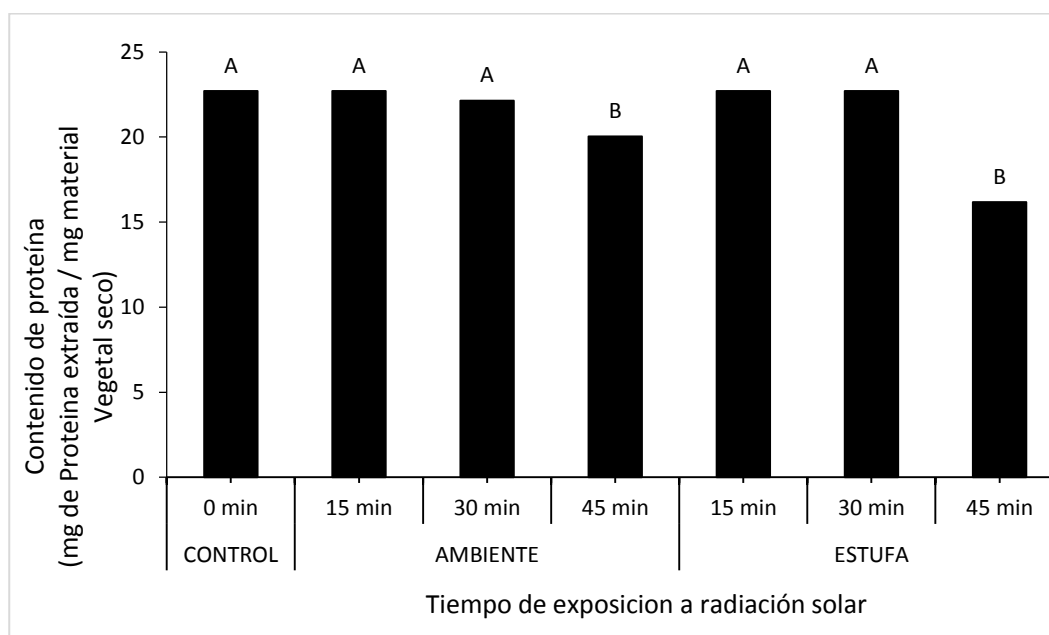


**Figura 7** Porcentaje de germinación de la semilla de chocho INIAP-450 ANDINO posterior a la radiación solar

En la radiación solar al ambiente, el mayor porcentaje de germinación se encontró a los 15 y 45 minutos de exposición, mientras que dentro de la estufa de fabricación casera se lo encontró a los 30 minutos de exposición. Estos mayores porcentajes de germinación no fueron diferentes estadísticamente entre sí, pero si lo fueron con respecto al control. Como se puede apreciar en la figura 7, el menor porcentaje de germinación lo presentó el control, por lo que se puede deducir anticipadamente, que el pretratamiento con radiación solar promueve la germinación en las semillas de chocho de la variedad INIAP – 450 ANDINO.

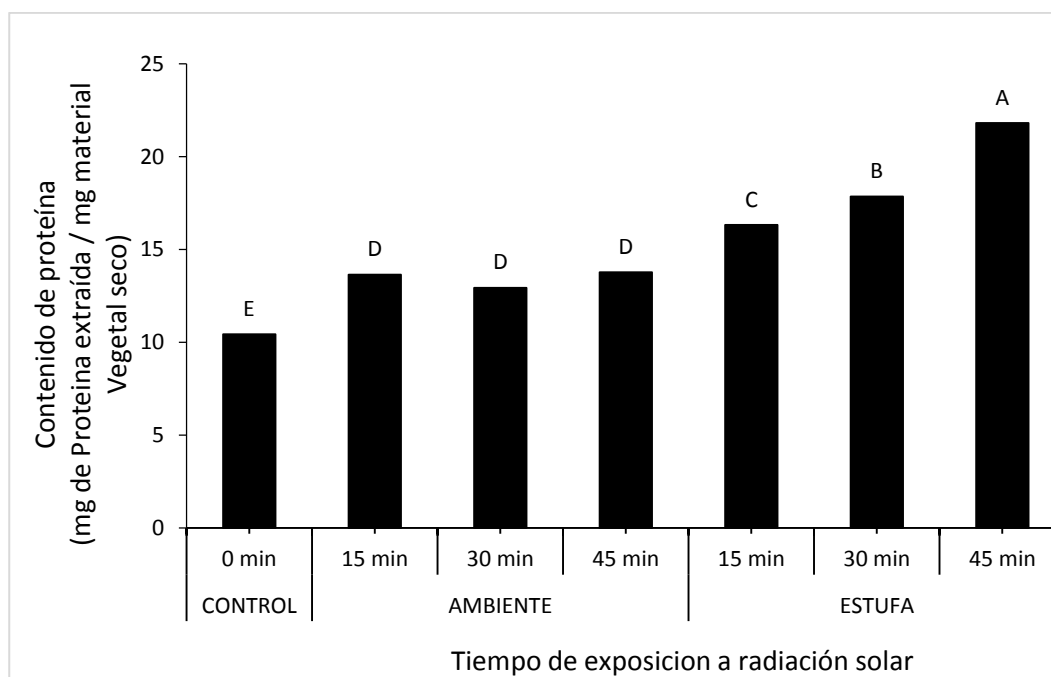
#### 4.4 Contenido de proteína

El contenido de proteína presente en las radículas y en las plúmulas obtenido de las semillas de chocho pertenecientes a cada uno de los tratamientos establecidos posterior al pretratamiento con radiación solar, se representaron en las figuras 8 y 9.



**Figura 8** Contenido proteico de las radículas obtenidas de semillas del genotipo INIAP-450 ANDINO

A nivel radicular, el contenido de proteína de las semillas de chocho pretratadas con radiación solar tanto dentro de la estufa como al ambiente por 15 y 30 minutos, no presentan diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo, a los 45 minutos de exposición tanto dentro de la estufa de fabricación casera como al ambiente, su contenido proteico se ve disminuido significativamente con respecto al control.

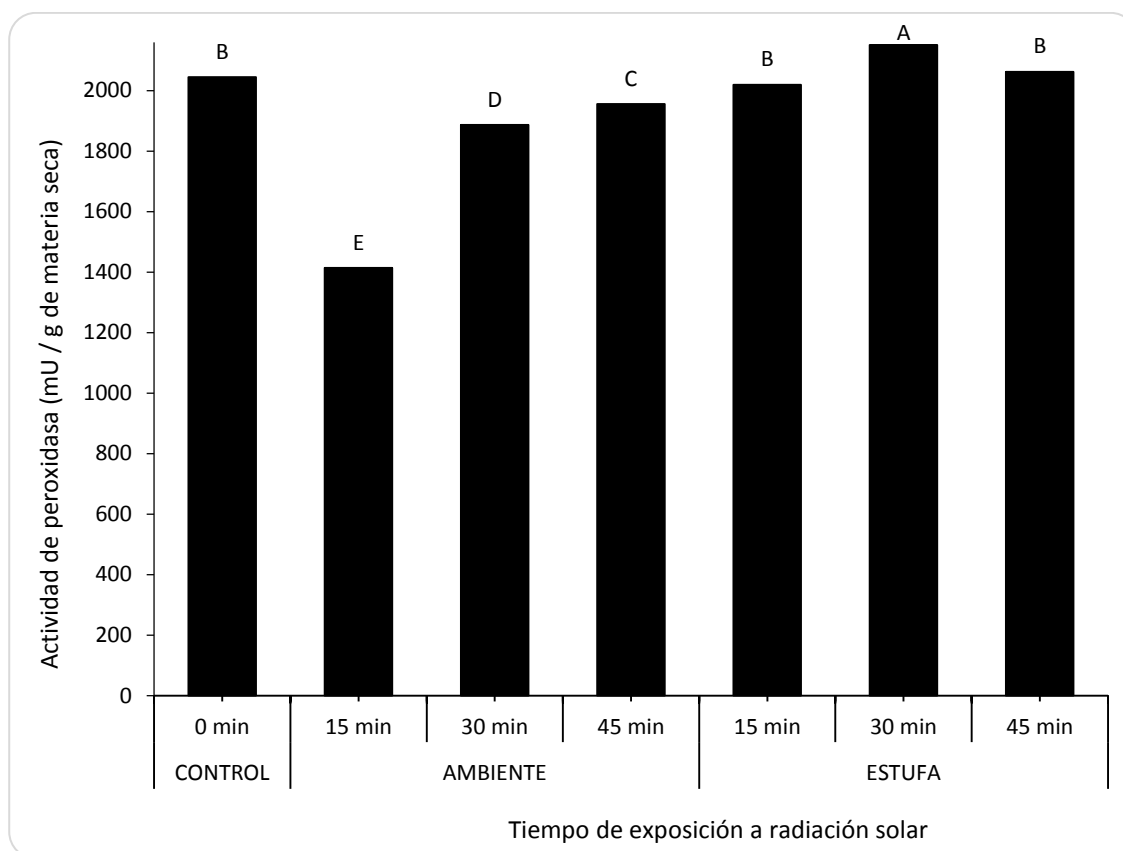


**Figura 9** Contenido proteico de las plúmulas obtenidas de semillas del genotipo INIAP-450 ANDINO

A nivel de plúmula, en donde ya comienza la actividad fotosintética, ya se puede evidenciar cambios significativos con respecto al contenido de proteína. El mayor contenido de proteína se lo encontró a los 45 minutos de exposición a radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera, mientras el menor contenido de proteína se lo evidenció en el control. El contenido de proteína en los tratamientos de exposición a radiación solar al ambiente no presenta diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con respecto al control.

#### 4.5 Cuantificación de la actividad de peroxidasa

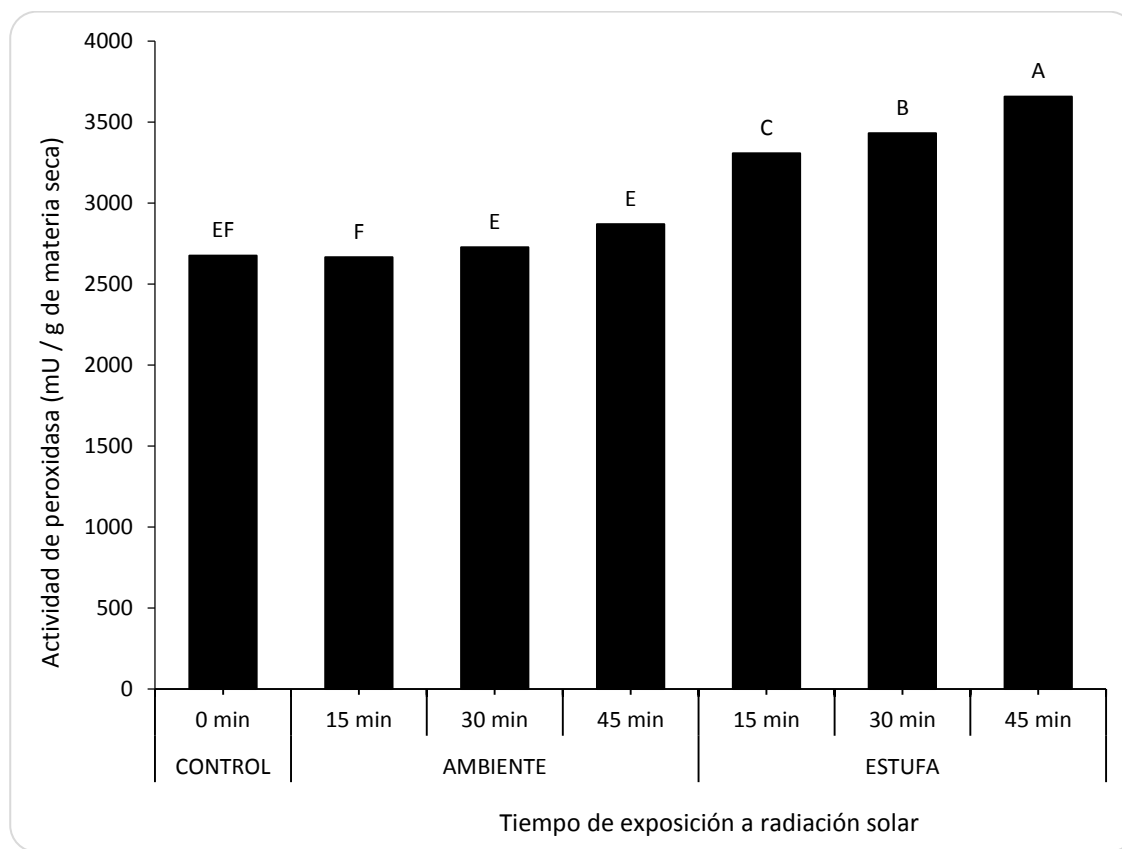
La cuantificación de la actividad enzimática de peroxidasa presente en las radículas y en las plúmulas obtenido de las semillas de chocho pertenecientes a cada uno de los tratamientos establecidos posterior al pretratamiento con radiación solar, se representaron en las posteriores figuras.



**Figura 10** Cuantificación de la actividad de peroxidasa de radículas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 - ANDINO

A nivel radicular, las radículas obtenidas de semilla tratada con 30 minutos de exposición a radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera, obtuvo la mayor actividad de peroxidasa con respecto al resto de tratamientos y el control. Para todos los tratamientos al ambiente, el control presentó una mayor actividad de peroxidasa que éstos; mientras que, para los tratamientos

dentro de la estufa de fabricación casera, el control presentó igual actividad de peroxidasa para los tiempos de 15 y 45 minutos de exposición, excepto el de 30 minutos, el cual fue significativamente mayor.

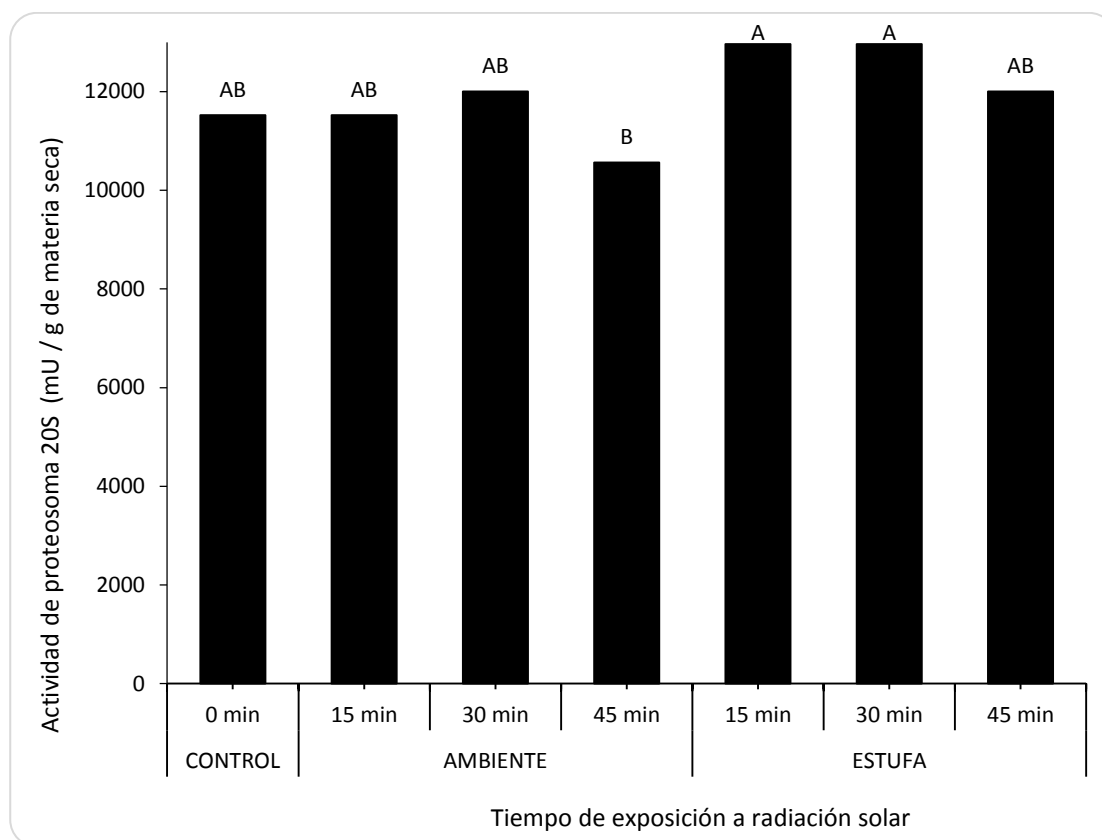


**Figura 11** Cuantificación de la actividad de peroxidasa de plúmulas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 - ANDINO

A nivel de plúmula, el tratamiento con 45 minutos de exposición a radiación solar en la estufa de fabricación casero presentó la mayor actividad enzimática con respecto al resto de tratamientos. De los tratamientos con exposición solar al ambiente, el tratamiento con 45 minutos fue el único tratamiento significativamente mayor al control.

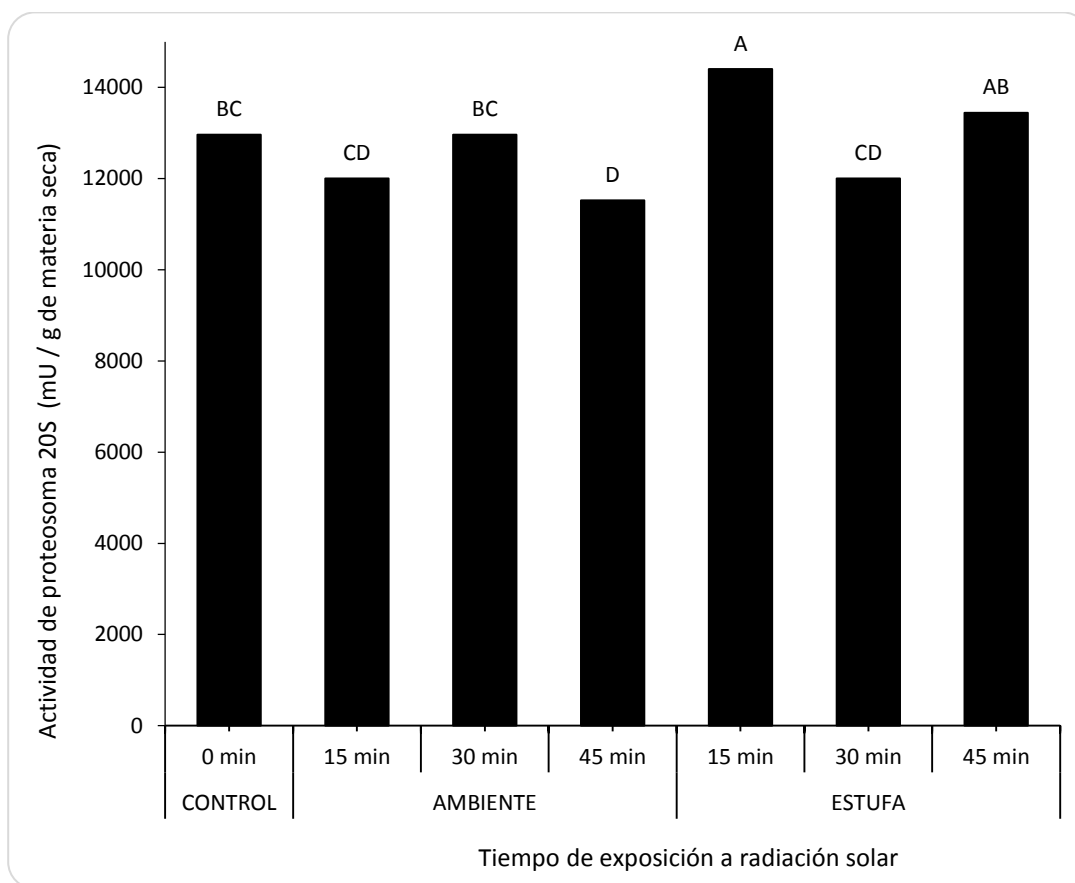
#### 4.6 Cuantificación de la actividad de proteosoma 20S

La cuantificación de la actividad enzimática de proteosoma 20S presente en las radículas y en las plúmulas obtenido de las semillas de chocho pertenecientes a cada uno de los tratamientos establecidos posterior al pretratamiento con radiación solar, se representaron en las posteriores figuras.



**Figura 12** Cuantificación de la actividad de proteosoma 20S de radículas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 – ANDINO

A nivel radicular, a pesar de la actividad de proteosoma 20S a los 15 y 30 minutos dentro de la estufa de fabricación casera presentaron los mayores valores de la actividad enzimática de proteosoma 20S, estos no fueron diferentes estadísticamente con respecto a los tratamientos al ambiente ni al control.



**Figura 13** Cuantificación de la actividad de proteosoma 20S de plúmulas obtenidas de semillas de chocho del genotipo INIAP 450 – ANDINO

A nivel de plúmula, el tratamiento con 15 minutos de exposición a radiación solar dentro de la estufa de radiación casera presentó la mayor actividad enzimática con respecto al resto de tratamientos; mientras que de los tratamientos al ambiente todos fueron significativamente menores al control.



## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la exposición de semilla a la radiación solar durante 15, 30 y 45 minutos dentro de la estufa de fabricación casera y al ambiente, donde se acumuló 2,33 y 2,71 MJ/m<sup>2</sup> respectivamente de radiación, conjuntamente con una temperatura de 74°C en el interior de la estufa de fabricación casera y de 41°C al ambiente; promovió el vigor de las semillas de chocho de manera general con respecto al testigo (semilla de chocho del genotipo INIAP-450 ANIDNO sin ningún tipo de radiación solar). El estrés causado por la radiación UV y las elevadas temperaturas contribuyen a erradicar microorganismos patógenos como es el caso de *Collectotrichum acutatum*, causante de la antracnosis en chocho, en donde investigaciones anteriores como los de Aizaga (2015) y Jarrín (2015) concluyen que dosis de 0,9 MJ/m<sup>2</sup> de radiación solar obtenida durante 60 minutos de exposición reduce significativamente el porcentaje de infección del patógeno. De hecho, Siddiqui et al., (2011) comprobaron que semillas de frejol mungo expuestas a 5, 10, 15 y 20 minutos de radiación presentaron porcentajes considerablemente menores de infección causada por *Fusarium spp.*, *R. solani* y *M. phaseolina*, por otra parte, en semillas de nuez los tiempos más eficaces para el control de *R. solani* y *M. phaseolina* fueron de 20, 30 y 60 minutos.

Adicionalmente al beneficio de erradicar microorganismos patógenos por parte de la radiación solar, Neelamegam & Sutha (2015) afirman que en semillas de nuez la radiación solar hasta en 60 minutos incrementa los parámetros de crecimiento, el vigor de la semilla y la producción total de biomasa. Las conclusiones de Neelamegam & Sutha (2015) compaginan con los resultados obtenidos de esta investigación, puesto que el porcentaje de humedad presente en las semillas pretratadas con cualquier tipo de radiación con un máximo de exposición de 45

minutos, no presentó ninguna diferencia estadística, adicionalmente el porcentaje de germinación y en contenido de proteína aumentó significativamente, lo que traducido en parámetros de crecimiento corresponde a una ventaja estratégica para el desarrollo de mayor biomasa, producción de flores y vainas.

El porcentaje de germinación se vio aumentado en todos los tratamientos con radiación solar. Sin embargo Teramura & Sullivan (1994) afirman que una prolongada exposición a radiación solar y altas temperaturas puede causar afectaciones en la geminación de las semillas y procesos fotosintéticos, por lo que se presume que las plantas de chocho presentarían sensibilidad al ser sometidas a dosis mayores a  $3 \text{ MJ/m}^2$  de radiación y temperaturas sobre los  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . La estimulación del porcentaje de germinación es comparable con el estudio de Siddiqui et al., (2011), que al exponer semillas de frejol durante 30 minutos a radiación solar obtuvo mayores porcentajes de germinación.

En adición a los beneficios anteriormente expuestos, Falconí & Yáñez (2017) y Alexieva et al. (2001) concluyen en sus investigaciones que la radiación solar promueve el vigor vegetal general y sobre todo de fotosíntesis, debido a la activación enzimática temprana en el interior de las semillas. Verma & Dubey (2003) aseguran que el estrés causado por radiación solar y la generación de radicales libres, permite que la semilla inicie un proceso de eliminación de peróxidos de hidrógeno por parte de la enzima peroxidasa, paralelamente el sistema ubiquitina-proteosoma comienza a funcionar, puesto que su función principal es reconfigurar proteínas dañadas o alteradas por el estrés calórico y presencia de microorganismos patógenos. Esta reconstrucción proteica, permitirá la presencia de nuevas proteínas distintas a las presentes en situaciones sin estrés beneficiando el vigor vegetal y aún más la temprana activación del sistema ubiquitina-proteosoma que es indispensable ante la presencia de patógenos. Conjunta y

paralelamente la activación de peroxidasa será asegurada, la cual ya estará funcionalmente presente en los tejidos de la planta en el caso de futuras situaciones de estrés calórico.

A pesar de no encontrar una diferencia significativa en la actividad de proteosoma 20S, el aumento significativo en el porcentaje de germinación, el contenido de proteína, y la actividad de peroxidasa se vieron totalmente favorecidos por la radiación solar, sobresaliendo los tratamientos dentro de la estufa de fabricación casera, y entre ellos destacando el tiempo de exposición por 30 minutos. Estos parámetros de vigor vegetal en acrecentamiento fueron similares a los encontrados por Falconí & Yáñez (2017) en donde la actividad de catalasa y peroxidasa de igual manera se vieron en aumento, aspectos que se según Eriksen & Whitney (1982) se traducirán en mejor fijación de nitrógeno en el suelo y en una mayor tasa fotosintética.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- Las semillas de chocho del genotipo INIAP – 450 ANDINO pretratadas con radiación solar al interior de una estufa de fabricación casera y al ambiente, presentó un aumento de manera general en su vigor, al presentar mayores valores de germinación, mayor contenido de proteína y mayor actividad de la enzima peroxidasa a nivel radicular y de plúmula.
- El contenido de humedad de las semillas de chocho pretratadas con radiación solar al interior de una estufa de fabricación casera y al ambiente, no presentaron una disminución con respecto al control (semillas sin radiación solar).
- El mayor porcentaje de germinación se encontró con 15 y 45 minutos de exposición a radiación solar al ambiente y con 30 minutos de exposición a radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera.
- El mayor contenido de proteína a nivel radicular se encontró a los 15 y 30 minutos de exposición a radiación solar tanto al ambiente como dentro de la estufa de fabricación casera. Mientras que, a nivel de plúmula, el mayor contenido de proteína se encontró a los 45 minutos de exposición a radiación solar dentro de la estufa de fabricación casera.
- La mayor actividad enzimática de peroxidasa a nivel radicular se encontró a los 30 minutos de exposición a radiación dentro de la estufa de fabricación casera. De igual manera, a nivel de plúmula, la mayor actividad enzimática de peroxidasa se encontró al exponer semilla de chocho a 45 minutos dentro de la estufa de fabricación casera.

- A nivel radicular, no se encontraron diferencias estadísticas para la actividad enzimática de proteosoma 20S entre los diferentes tratamientos. Pero a nivel de plúmula, el tratamiento con 15 minutos de exposición a radiación solar dentro de una estufa de fabricación casera presentó la mayor actividad enzimática con respecto al resto de tratamientos y el control.
- Globalmente, el tratamiento con 30 minutos de minutos de exposición a radiación solar dentro de una estufa de fabricación casera promueve el mayor vigor a la semilla de chocho del genotipo I-450 Andino, pues presenta aumentos significativos en el porcentaje de germinación, contenido de proteína y actividad enzimática de peroxidasa.

## **6.2 Recomendaciones**

- Se recomienda realizar más estudios enzimáticos de chocho a nivel de plúmula y en hojas verdaderas, ya que de esta manera se podrá entender de mejor manera el comportamiento enzimático de las semillas de chocho pretratadas con radiación solar.
- Se recomienda realizar análisis de mayor número de muestras de la actividad enzimática de proteosoma 20S a nivel de plúmula y de hojas verdaderas diferentes genotipos de chocho para poder entender de mejor manera las acciones de esta enzima en diferentes genotipos y etapas fenológicas del chocho, ya que esta enzima corresponde a un buen indicador del vigor vegetal por su gran participación en la defensa vegetal ante patógenos y situaciones de estrés por factores abióticos.

### 6.3 Bibliografía

- Aizaga, J. (2015). *Efecto de distintos tiempos de exposición a la radiación solar para reducir infección de antracnosis (Colletotrichum acutatum) en semilla de chocho (Lupinus mutabilis)*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Australian Government. (2013). The Biology of Lupinus L . (lupin or lupine ). *Department of Health and Ageing - Office of the Gene Technology Regulator*, (April), 66.
- Barbato, R., Bergo, E., Szabò, I., Dalla Vecchia, F., & Giacometti, G. M. (2000). Ultraviolet B exposure of whole leaves of barley affects structure and functional organization of photosystem II. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10976–10982. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10976>
- Bergo, E., Segalla, A., Giacometti, G. M., Tarantino, D., Soave, C., Andreucci, F., & Barbato, R. (2003). Role of visible light in the recovery of photosystem II structure and function from ultraviolet-B stress in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 54(388), 1665–1673. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg180>
- Brown, J. E., Lu, T. Y., Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., ... Droby, S. (2001). The effect of low dose ultraviolet light-C seed treatment on induced resistance in cabbage to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). *Crop Protection*, 20(10), 873–883. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00037-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00037-0)
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2000). Zonificación potencial, sistemas producción y procesamiento artesanal del chocho en Ecuador. *Boletín Técnico INIAP, Programa N(89)*.

- Caicedo, C., Peralta, E., Murillo, A., & Rivera, M. (2010). INIAP 450 ANDINO. Variedad de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Boletín Técnico Estación Experimental Santa Catalina*.
- Caicedo, C., Peralta, E., & Rivera, M. (2001). El Cultivo de Chocho, Fitonutrición, plagas y enfermedades. *Boletín Técnico INIAP*, 47.
- Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. *Idesia (Arica)*, 59–76. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>
- Chen, J.-H. (2006). The Combined Use of Chemical and Organic Fertilizers and/or Biofertilizer for Crop Growth and Soil Fertility. *International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use*, (October), 1–11.
- Cuervo, D., Martínez, S., Ardila, H., & Higuera, B. (2009). Differential Induction of Peroxidase Enzyme and Its. *Revista Colombiana de Química*, pp. 379–393.
- Eriksen, F. I., & Whitney, A. S. (1982). Growth and N Fixation of Some Tropical Forage Legumes as Influenced by Solar Radiation Regimes<sup>1</sup>. *Agronomy Journal*, 74, 703–709. <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400040026x>
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., & Candela, M. E. (2005). Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anuales de Biología*, 27, 143–153.
- Falconí, C. E. (2012). *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance. *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=20123175902&lang=es&site=ehost-live>
- Falconí, C. E., & Yáñez-Mendizábal, V. (2017). Efficacy of UV-C radiation to reduce seedborne

- anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) from Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Plant Pathology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/ppa.12793>
- Gipchocho. (2015). Mejora de la Cadena Productiva del Chocho. Retrieved from <http://gipchocho.espe.edu.ec/>
- Herrero, J. (2014). *Análisis estructural y funcional de las peroxidasas implicadas en la biosíntesis de ligninas en mutantes de arabidopsis*. Universidad de Alcalá.
- INEC. (2016). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (BBD). Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec//encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continua-bbd/>
- Invitrogen. (2009). Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit. Retrieved from <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp22188.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/85C30240-FD1C-41E0-A59E-009664024F4A>
- Jacobsen, S. E., Mujica, A., & Ortiz, R. (2003). The Global Potential for Quinoa and Other Andean Crops. *Food Reviews International*, 19(1–2), 139–148. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018880>
- Jacobsen, S., & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botanica Economica de Los Andes Centrales- Universidad Mayor de San Andrés*, 458–482.
- Jarrín, A. (2015). *Efecto de la radiación solar en infecciones de antracnosis (C. acutatum) en semilla y en el posterior rendimiento del chocho*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Kacharava, N., Chanishvili, S., Badridze, G., Chkhubianishvili, E., & Janukashvili, N. (2009). Effect of seed irradiation on the content of antioxidants in leaves of Kidney bean, Cabbage and Beet cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 3(3), 137–145.



- Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., Zaitlin, D., Pierce, A. J., & Smalle, J. A. (2009). Loss of 26S Proteasome Function Leads to Increased Cell Size and Decreased Cell Number in Arabidopsis Shoot Organs. *Plant Physiology*, 150(1), 178–189. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135970>
- Lacis, A. A., & Hansen, J. E. (1974). A Parameterization for Absorption of Solar Radiation in the Earth's Atmosphere. *Journal of the Atmospheric Sciences*. [https://doi.org/10.1175/1520-0469\(1974\)031<0118:APFTAO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0469(1974)031<0118:APFTAO>2.0.CO;2)
- Liu, B. Y. H., & Jordan, R. C. (1960). The interrelationship and characteristic distribution of direct, diffuse and total solar radiation. *Solar Energy*, 4(3), 1–19. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-092X\(60\)90062-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-092X(60)90062-1)
- MA-56. (1998-2018). Estación Meteorológica IASA I. Registros diarios de parametros climaticos. Base de datos. Sangolqui, Ecuador.
- Neelamegam, R., & Sutha, T. (2015). Original Research Article UV-C Irradiation Effect on Seed Germination , Seedling Growth and Productivity of Groundnut ( *Arachis hypogaea* L . ). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(8), 430–443.
- Peralta, E. (2016). El c(hocho en Ecuador. El “Estado del Arte.” *Bolentin Técnico INIAP, PRONALEG-GA*, 1–12.
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, Á., Rivera, M., Rodriguez, D., Lomas, L., & Monar, C. (2012). Manual Agrícola de Granos Andinos (Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco). *Bolentin Técnico INIAP*, 1–68.
- Perpiñán, O. (2011). *Radiación Solar y Energía Solar Fotovoltaica*. Retrieved from <http://www.blogdequk.com/2011/04/la-radiacion-termica-y-radiacion-solar.html>
- Peykarestan, B., & Seify, M. (2012). UV irradiation effects on seed germination and growth ,

- protein content , peroxidase and protease activity in redbean. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(1), 92–102.
- Rocha-sosa, M. (2013). L Sistema Ubicuitina / Proteasoma En La Interacción Planta - Patógeno, *16*(2), 121–131.
- Rogozhin, V. V, Kuriliuk, T. T., & Filippova, N. P. (2000). Change in the reaction of the antioxidant system of wheat sprouts after UV-irradiation of seeds. *Biofizika*, 45(4), 730–736. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/11040985>
- Salama, H. M. H., Al Watban, A. A., & Al-Fughom, A. T. (2011). Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.10.002>
- SICA, MAGAP, & INEC. (2003). Censo Nacional Agropecuario (CNA). Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Babiyshuk, E., Kushnir, S., Durski, A., & Vierstra, R. D. (2002). Cytokinin growth responses in Arabidopsis involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell*, 14(1), 17–32. <https://doi.org/10.1105/tpc.010381.2>
- Teramura, a H., & Sullivan, J. H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research*, 39(3), 463–473. <https://doi.org/10.1007/BF00014599>
- Terán, I. (2016). *Pretratamiento de semilla con radiación solar y su efecto en la incidencia de antracnosis (Colletotrichum acutatum) en dos etapas fenológicas de chocho (Lupinus mutabilis)*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Thermo Scientific. (2007). BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Kit. *BCA Protein Assay Kit*. <https://doi.org/10.1016/j.ijproman.2010.02.012>

- Üstün, S., Sheikh, A., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A., Ntoukakis, V., & Börnke, F. (2016). The Proteasome Acts as a Hub for Plant Immunity and Is Targeted by *Pseudomonas* Type III Effectors. *Plant Physiology*, *172*(3), 1941–1958. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00808>
- Vass, I., Sass, L., Spetea, C., Bakou, A., Ghanotakis, D., & Petrouleas, V. (1996). UV-B-Induced Inhibition of Photosystem II Electron Transport Studied by EPR and Chlorophyll Fluorescence. Impairment of Donor and Acceptor Side Components †. *Biochemistry*, *35*, 8964–8973.
- Verma, S., & Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, *164*(4), 645–655. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
- Walker, J., Herthel, K., Parker, P., & Edwards, J. (2011). Lupin growth and development. *Procrop*, *94*.
- Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yao, Y., Wang, C. C., & Hill, C. P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature*, *408*(6808), 115–120. <https://doi.org/10.1038/35040607>
- Wilson, C., & Heidinger, G. (2002). (12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2002/0187020 A1 (Vol. 1).