



**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: “PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA EN PLANTAS DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis*)
PROVENIENTES DE SEMILLA TRATADA CON RADIACION
SOLAR PARA ERRADICAR ANTRACNOSIS (*Colletotrichum
acutatum*). ” (Segunda Fase).-**

AUTOR: ANDRADE GALÁN, CARLOS ANDRÉS

DIRECTOR: FALCONÍ SAÁ, CESAR EDUARDO., PhD.

SANGOLQUÍ

2017



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

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PLANTAS DE CHOCHO (Lupinus mutabilis) PROVENIENTES DE SEMILLA TRATADA CON RADIACION SOLAR PARA ERRADICAR ANTRACNOSIS (Colletotrichum acutatum).*” realizado por el señor *ANDRADE GALÁN CARLOS ANDRÉS*, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor *ANDRADE GALÁN CARLOS ANDRÉS* para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de noviembre del 2017

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'César Falconí Saá', is enclosed within a blue oval. Below the signature, there is a horizontal dashed line.

César Falconí Saá PhD.

DIRECTOR



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

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *ANDRADE GALÁN CARLOS ANDRÉS*, con cédula de identidad N° 1721441861, declaro que este trabajo de titulación “*PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PLANTAS DE CHOCHO (Lupinus mutabilis) PROVENIENTES DE SEMILLA TRATADA CON RADIACION SOLAR PARA ERRADICAR ANTRACNOSIS (Colletotrichum acutatum)*” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 16 de noviembre del 2017

A handwritten signature in blue ink, which appears to be 'Carlos Andrés Andrade Galán', is written above a horizontal dashed line.

CARLOS ANDRÉS ANDRADE GALÁN

C.C 1721441861



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

AUTORIZACIÓN

Yo, *CARLOS ANDRÉS ANDRADE GALÁN*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “*PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PLANTAS DE CHOCHO (Lupinus mutabilis) PROVENIENTES DE SEMILLA TRATADA CON RADIACION SOLAR PARA ERRADICAR ANTRACNOSIS (Colletotrichum acutatum)*” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 16 de noviembre del 2017

CARLOS ANDRÉS ANDRADE GALÁN

C.C 1721441861

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mis padres y hermanas por ser siempre mi fuente de motivación, porque siempre han respetado mis decisiones y han sabido guiarme en la vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, institución que a través de los profesores se ha encargado de brindarme los conocimientos necesarios para formarme profesionalmente.

Especialmente al Doctor César Falconí por su disposición, paciencia, tiempo, conocimientos y por darme la oportunidad de realizar este trabajo junto a su grupo de investigación. A los compañeros del laboratorio Darwin, Karol y Carolina. También a los evaluadores de la tesis por su aporte para mejorar este trabajo.

Al proyecto mejora de la cadena productiva del chocho en Ecuador financiado por la SENESCYT por los fondos para poder realizar este trabajo.

Finalmente a mi familia por su apoyo emocional, consejos y buenos deseos hacia a mí.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 El Problema	2
1.2.1 Los Efectos	3
1.2.2 Las Causas	3
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Hipótesis	4
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 El Chocho	5
2.2 Semilla	5
2.3 Antracnosis	6
2.3.1 Síntomas	6
2.3.2 Control de la enfermedad	6
2.4 Radiación Solar	7
2.4.1 Radiación solar en plantas	7
2.5 Actividad Enzimática	9
2.5.1 Peroxidasa	9

2.5.2	Proteasa	10
2.5.3	Proteasoma	11
CAPÍTULO III		
METODOLOGÍA		12
3.1	Ubicación del lugar de investigación	12
3.1.1	Ubicación política	12
3.1.2	Ubicación geográfica	12
3.1.3	Ubicación ecológica	12
3.2	Materiales	13
3.2.1	Materiales para crecimiento de plántulas	13
3.2.2	Materiales de laboratorio.....	13
3.2.3	Reactivos	13
3.3	Métodos.....	13
3.3.1	Solarización de semilla de chocho	13
3.3.2	Crecimiento de las plántulas	13
3.3.3	Análisis enzimático	14
3.3.4	Actividad de peroxidasa	14
3.3.5	Proteasoma	15
3.3.6	Proteasa	15
3.4	Diseño Experimental	16
3.4.1	Factores a probar	16
3.4.2	Tratamientos a comparar.....	16
3.4.3	Tipo de diseño	16
3.4.4	Número de repeticiones.....	17
3.4.5	Características de las Unidades Experimentales	17
3.4.6	Croquis del diseño.....	17
3.5	Análisis Estadístico	18
3.5.1	Esquema de Análisis de Varianza	18
3.5.2	Coefficiente de variación.....	18
3.5.3	Variables a Medir	18

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Resultados	20
4.1.1 Acumulación de radiación solar	20
4.1.2 Porcentaje de Germinación a los 7 días	21
4.1.3 Número de días para alcanzar el 50% de germinación en semillas pretratadas con radiación solar	22
4.1.4 Tiempo medio de emergencia de plántulas de chocho tratado con radiación solar	23
4.1.5 Altura de las plántulas provenientes de semilla pre tratada con radiación solar	24
4.1.6 Longitud de la raíz en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar	25
4.1.7 Actividad del proteasoma 20s en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar	26
4.1.8 Actividad de la peroxidasa en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar	27
4.1.9 Actividad de las proteasa en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar	28
4.2 Discusión	29

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
5.1 Conclusiones	32
5.2 Recomendaciones	33
5.3 Bibliografía	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos aplicados a las semillas de chocho.....	16
Tabla 2 Análisis de varianza para el diseño experimental del estudio.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fotografía lugar de investigación	12
Figura 2 Croquis del diseño	17
Figura 3 Radiación acumulada MJ.m-2.h-1 a los 15, 30, 45 y 60 minutos de exposición de la semilla en la estufa de fabricación casera, Hacienda El Prado (IASA 1), San Fernando, Ecuador.....	20
Figura 4 Efecto de la exposición a la radiación solar en el porcentaje de germinación de semilla ECU-722, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$	21
Figura 5 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en el tiempo medio de emergencia, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$	23
Figura 6 Efecto la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en la altura de las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$	24
Figura 7 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU 722 en la longitud de la raíz de las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$	25
Figura 8 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU 722 en la actividad del proteasoma 20s de las plántulas, Hacienda El Prado	

(IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher 26

Figura 9 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en la actividad de la peroxidasa en las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher P..... 27

Figura 10 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en la actividad de las proteasas en las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher P..... 28

RESUMEN

La antracnosis representa un grave problema para el chocho, en ese sentido se ha planteado como alternativa de control de esta patología la desinfección de semillas sometiendo a la radiación solar, sin embargo un incremento de la radiación de la porción UV podría generar efectos negativos en las plantas. Semillas de chocho de la línea ECU- 722 fueron sometidas a 15, 30, 45 y 60 minutos a la radiación solar en una estufa casera; obteniéndose dosis acumuladas de 0,47 MJ/m², 1,129 MJ/m², 1,828 MJ/m² y 2,578 MJ/m² respectivamente. Se encontró que el porcentaje de germinación no resultó afectado por efecto de la radiación; en cuanto al número de días para alcanzar el 50% de germinación y el tiempo medio de emergencia a los treinta minutos disminuyó el número de días mientras que a los 60 minutos el número de días se incrementó; del mismo modo la altura de las plántulas fue mayor en las provenientes de las semillas sometidas a 30 minutos mientras las sometidas a 60 minutos mostraron las alturas más bajas; el largo de las raíces fue mayor en las expuestas a 30 y 45 minutos que el de las semillas que no fueron sometidas a la radiación; en cuanto a la actividad de la peroxidasa se encontró que ninguno de los tratamientos afectó a ésta, mientras que las proteasa y contenido de proteasoma 20s se vieron incrementados con el tratamiento de 60 minutos en relación al testigo.

PALABRAS CLAVES:

- **RADIACIÓN SOLAR**
- **PEROXIDASA**
- **PROTEASA**
- **PROTEASOMA**

ABSTRACT

Anthraco-nose represents a serious issue for lupin crop, in that sense it has been proposed as an alternative to control this pathology the disinfection of seeds by subjecting them to solar radiation, however an increase in solar ultraviolet-B irradiance may generate negative effects on the plants. Lupin seeds of ECU-722 genotype were subjected to 15, 30, 45 and 60 minutes to the solar radiation in a homemade stove; obtaining accumulated doses of 0,47 MJ/m², 1,129 MJ/m², 1,828 MJ/m² y 2,578 MJ/m² respectively. The aim was to evaluate the effect of the solar radiation generates in the growth and in some indicators of stress in the plants as the antioxidant enzymes. Results showed that percent germination was slightly increased at 15 and 30 minutes; however germination percentage was not affected by solar radiation. Time taken for 50% germination and mean emergence time was decreased at 30 minutes while at 60 minutes was increased; in the same way the height of the seedlings was greater in those coming from the seeds subjected to 30 minutes while those subjected to 60 minutes showed the lowest heights; roots length was greater in those exposed to 30 and 45 minutes than those that were not subjected to solar radiation; Peroxidase activity was not affected by solar radiation, while protease activity and proteasome 20s content were increased with the 60 minute treatment as compared with non-irradiated control.

KEY WORDS:

- **SOLAR RADIATION**
- **PEROXIDASE**
- **PROTEASE**
- **PROTEASOME**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El chocho (*Lupinus mutabilis*) es un cultivo que presenta un elevado valor nutritivo debido a su alto porcentaje proteico que varía entre 41 y 51% como indica Gross (1982) además de su bajo porcentaje de grasa (14-24%). Esta planta a pesar de ser nativa de la región andina, en nuestro país presenta bajos rendimientos de alrededor de 300kg /ha (Moreno, 2008).

Los problemas de bajos rendimientos pueden deberse a factores como la falta de asistencia técnica, uso de semillas infectadas, el ataque de plagas y enfermedades. Dentro de las enfermedades destaca la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* (Falconí, Visser, & van Heusden, 2013). Por su capacidad de infectar las semillas y de diseminarse por factores como los insectos, la lluvia, las herramientas esta enfermedad puede ocasionar graves pérdidas para los productores de incluso el 100% (Pinto & Tiaguaro, 2012).

Tradicionalmente se ha venido combatiendo este patógeno con productos químicos, los cuales representan potenciales problemas ambientales así como también pueden llegar a afectar la salud de quienes los aplican, sumado al inconveniente de la posibilidad de generar resistencia en los patógenos al ser incorrectamente aplicados. Es por lo anteriormente expuesto que es necesario generar alternativas de control.

Una opción eficiente ha sido el uso de estufas de solarización de fabricación casera con el fin de emplear el poder combinado de la radiación solar y la temperatura, la solarización ha resultado buena desinfectante adicional a esto se ha encontrado que el número de vainas por planta y el peso de semilla total fueron mayores en semillas tratadas con radiación solar que las que no fueron tratadas con radiación (Terán, 2016).

Si bien la radiación solar ha traído resultados favorables para la desinfección de la semilla de chocho, se han reportado efectos negativos particularmente de la porción UV de ésta sobre la fisiología de las plantas. (Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012) sometieron dos variedades de verdolaga a dosis de radiación de 220 a 400 nm; se encontró que el porcentaje de germinación y la tasa de crecimiento estuvieron inversamente relacionados a la dosis de radiación. Concluyeron también

que las dosis superiores a 300nmUV no alteraron el contenido de proteína, actividad de peroxidasa y proteasa.

(Liu, Liu, Li, & Herbert, 2013) comprobaron que la radiación UV-B alteró las características agronómicas y disminuyó el rendimiento por planta de la soya.

1.1 Justificación

La antracnosis es la principal enfermedad que afecta al cultivo de chocho como menciona (Falconí, 2012). Por tal motivo es necesaria la búsqueda de alternativas para el control de la enfermedad y una de esas es la desinfección de la semilla con el empleo de la radiación solar.

La exposición de semillas de chocho a la radiación solar ha generado buenos resultados en cuanto a la disminución de la infección de *C. acutatum*. En anteriores investigaciones (Jarrín, 2014), ha establecido tiempo y días de exposición de las semillas al sol. (Aizaga, 2015) determinó que una exposición de 60 minutos a la radiación solar redujo el patógeno en 99,25%. Mientras (Jarrín, 2017) comprobó que a los 45 y 60 minutos de solarización los porcentajes de infección fueron menores en comparación con el testigo y el tratamiento químico.

En este estudio se buscó conocer como la radiación solar afecta algunos parámetros de crecimiento de la planta así como parámetros fisiológicos a través de la determinación de la actividad de determinadas enzimas.

1.2 El Problema

El patógeno *Colletotrichum acutatum* responsable de la antracnosis en chocho como indica (Falconí, 2012), es capaz de permanecer en la semilla por más de dos años. Se han encontrado que la exposición de las semillas de chocho a la radiación solar constituye una herramienta eficaz para la desinfección. Pero el sometimiento del material vegetal a la radiación solar puede traer consigo alteraciones fisiológicas o bioquímicas en la planta.

1.2.1 Los Efectos

Factores como la sequía, temperaturas extremas, salinidad, radiación UV, metales pesados, polución entre otros provocan en las plantas estrés abiótico el cual conlleva a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), se ha visto que éstas últimas pueden provocar daños en lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN (Gill & Tuteja, 2010).

Semillas de frejol negro sometidas por 10, 20, 30 y 40 minutos a radiación UV-B se vieron afectadas en el porcentaje de germinación a partir de los 20 minutos de exposición así como la altura de las plantas mientras que la longitud de la raíz se vio afectada con todos los tratamientos (Shaukat, Farooq, Siddiqui, & Zaidi, 2013)

Como respuesta al estrés se ha visto que la actividad enzimática se incrementa como la proteasa para remover proteínas anormales, mal plegadas y reconstruir nuevas con los aminoácidos disponibles (Peykarestan & Seify, 2012). En la presente investigación se busca determinar si la exposición de semilla de chocho a la radiación solar causa alguna alteración en la fisiología de la planta.

1.2.2 Las Causas

Se ha venido desarrollando la desinfección de semillas de chocho con la radiación solar, sin embargo alteraciones en el ozono estratosférico han provocado un aumento en la penetración de la radiación UV-B en la Tierra; la cual es efectiva en provocar reacciones fotoquímicas (Caldwell & Flint, 1994).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar parámetros morfológicos y actividad enzimática de plantas de chocho provenientes de semilla tratada con diferentes tiempos de exposición a la radiación solar para erradicar antracnosis.

1.3.2 Objetivos específicos

- Valorar el efecto de la radiación solar en semilla pretratada con radiación solar en el porcentaje de germinación, altura de las plántulas y longitud de la raíz.
- Determinar la actividad de proteasa, peroxidasa y proteasoma de plantas en chocho proveniente de semilla pretratada con radiación solar.

1.4 Hipótesis

HIPÓTESIS ALTERNA (H1): La exposición a la radiación solar de semilla de chocho provocará cambios morfológicos y alterará la actividad enzimática en las plantas.

HIPÓTESIS NULA (H0): La exposición a la radiación solar de semilla de chocho no provocará cambios morfológicos y no alterará la actividad enzimática en las plantas.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El Chocho

Si bien su origen es discutible, lo más probable es que las culturas precolombinas de los Andes hayan domesticado a este cultivo debido a que se han encontrado semillas en vasijas de la cultura nazca, así como también se han visto representaciones del chocho en otras culturas de los andes (Castañeda, 1988).

Capaz de adaptarse a distintos tipos de suelos, es una planta herbácea que crece casi sin ramificaciones hasta una altura promedio que varía entre 1,8m y 2m (Caicedo & Peralta, 2001). Constituye un gran abono, esta leguminosa puede fijar nitrógeno en hasta en 100kg/ha. (Jacobsen & Mujica, 2012) Para cumplir con esto último destaca en el sistema radicular la existencia de una gran cantidad de nódulos que contienen bacterias del género *Rhizobium* (Tapia & Fries, 2007), además de su capacidad de controlar la erosión gracias a su raíz lignificada, vigorosa y ramificada. Esta planta se adapta con facilidad a alturas comprendidas entre 2500 y 3400 msnm de la región andina en donde muchas veces los agricultores la emplean como repelente de plagas debido al contenido de alcaloides presentes (Falconí, 2012).

El valor nutritivo de esta planta radica en los ácidos grasos esenciales y proteínas presentes así tenemos que contiene 20 % de ácido linoleico y oleico (Borek, Pukacka, Michalski, & Ratajczak, 2009). Mientras que los valores de contenido de proteína varían de 35 a 45%, sin embargo hay que decir que existe una correlación negativa entre el nivel de proteína y el contenido de ácidos grasos (Jacobsen & Mujica, 2006).

2.2 Semilla

El tamaño varía de 4 a 15mm lo cual depende de las condiciones de crecimiento como también de la variedad (Rivadeneira, 2012). Y si bien su forma es variada se puede decir que son elipsoidales, lenticulares (Tapia & Fries, 2007).

El color de la semilla varía e incluye blanco, gris, baya, marrón, negro e incluso de color marmoteado (Tapia & Fries, 2007). Las semillas constan de testa y embrión el cual consiste de dos cotiledones, los cuales representan aproximadamente el 17% del peso de la semilla (Jarrín, 2014).

2.3 Antracnosis

Causada por *Colletotrichum acutatum* genera problemas tanto en campo como en post cosecha, y por su capacidad de generar infecciones latentes es considerado el patógeno más importante del chocho. *Colletotrichum acutatum* es portado en la semilla y prefiere los ambientes húmedos, las características ambientales de la serranía ecuatoriana favorecen el desarrollo del patógeno (Falconí, 2012).

Al encontrarse oculto en la semilla puede producir plantas que presentan lesiones en las que se generan esporas en abundancia de fácil diseminación a través de la lluvia, viento entre otros. De esta forma puede llegar a infectar a todo el cultivo (Thomas & Sweetingham, 2003).

2.3.1 Síntomas

Puede afectar a todos los órganos del chocho, siendo el síntoma más representativo el doblamiento o curvatura del tallo y peciolos. El doblamiento en el tallo se produce en los brotes en los ápices de crecimiento y como consecuencia el tallo continúa creciendo y se curva de forma similar a un bastón (Pinto & Tiaguaro, 2012).

Se pueden presentar también lesiones en el tallo color café oscuro de hasta unos dos centímetros, mientras que en las hojas se puede observar manchas con verdes de color café oscuro. En la semilla se puede presentar deformidad de la misma o presentar masas de esporas de color rosado; en algunas ocasiones las semillas pueden estar infectadas sin mostrar síntomas (Thomas & Sweetingham, 2003).

2.3.2 Control de la enfermedad

Tradicionalmente se ha venido controlando a esta enfermedad con productos químicos que contengan como ingredientes activos a: benomil, carbendazim, clorotalonil, difenoconazol o propineb (Peralta, y otros, 2012). Si bien estos productos pueden disminuir el proceso infeccioso pero no erradican al patógeno de las semillas infectadas (Thomas & Sweetingham, 2003).

(Peralta, y otros, 2012) también recomienda el uso de semillas de buena calidad que preferentemente sean obtenidas de lugares que no favorezcan a la enfermedad como son áreas secas o con poca lluvia.

2.4 Radiación Solar

Se denomina radiación a la difusión de ondas o partículas desde una fuente por el espacio. Concretamente la radiación solar es producida en el sol y se dirige en todas las direcciones a través de ondas electromagnéticas, que no necesitan de un medio para difundirse al llegar a la Tierra cumple un papel importante en el proceso de fotosíntesis (Insunza, 2006).

La radiación solar es por mucho la principal fuente de energía de la Tierra, a pesar de la distancia entre la Tierra y el Sol; se estima que en cualquier momento la Tierra intercepta aproximadamente 180×10^6 GW (Wald, 2007).

Menos de la mitad de la radiación que alcanza la Tierra ingresa hasta el suelo debido a que ésta es absorbida por los constituyentes químicos cuando atraviesa la atmósfera. El ozono absorbe la mayoría de la porción ultravioleta, también el dióxido de carbono, vapor de agua, oxígeno y otros gases son capaces de absorber, dispersar y reflejar la radiación (Wald, 2007).

La radiación solar puede ser dividida en tres regiones. La luz apreciable por el ojo humano se encuentra comprendida en un rango de 400nm y 760 nm, coincidiendo con el rango que es útil para la fotosíntesis de las plantas (Hernández, Escobar, & Castilla, 2001).

Longitudes de onda menores que la apta para la fotosíntesis están dentro del rango de la radiación UV y ésta porción puede a su vez ser dividida en UV-A (380-215nm), UV-B (315-280nm) y UV-C (280-10nm), éstas longitudes de onda cortas pueden causar daño a las plantas debido a la energía asociada a las longitudes de onda cortas (Shetta & Areaf, 2009).

Los niveles de radiación ultravioleta que alcanzan la Tierra dependen de factores como la cantidad de ozono, la hora del día, la época del año, la latitud siendo la región ecuatorial en donde los rayos del sol son más fuertes, la altitud favorece al incremento de los niveles de radiación UV al haber menos atmósfera para absorber los rayos (EPA, 2010).

2.4.1 Radiación solar en plantas

La radiación solar es captada por las plantas y se constituye en la fuente de energía para los procesos fisiológicos de fotosíntesis y transpiración. La porción

comprendida entre 400 y 760nm resulta ser la más eficiente para el proceso fotosintético (Campillo, Fortes, & Del Henar, 2012).

La radiación solar se ha venido empleando como método de desinfección en semilla, al ser una opción económica y fácil de realizar. La ley de desplazamiento de Wein indica que la longitud de onda de la radiación emitida es inversamente proporcional a la temperatura del objeto. Por tanto la radiación solar al ser de onda corta penetra a través del plástico y es absorbida por la semilla, mientras que la radiación producida por la semilla no es capaz de atravesar el plástico debido a que esta es de onda más larga (Terán, 2016).

Radiaciones comprendidas entre 980,58 y 1074,431 (J/m^2) han sido eficientes en la disminución de la infección hasta en 99,25%, incluso los tratamientos han visto incrementada la germinación en 17% (Aizaga, 2015)

Se ha observado que el porcentaje de germinación de conidias del patógeno *Venturia inaequalis* decrece significativamente con el tiempo y dosis de radiación solar, mientras por el contrario las conidias que no fueron expuestas al sol no disminuyen significativamente el porcentaje de germinación (Aylor & Sanogo, 1997). La radiación solar reduce directamente la supervivencia de esporas; también se conoce que en la porción UV de la radiación cuando las longitudes de onda son más largas se requieren de más dosis de radiación que cuando existen longitudes de onda más cortas (Rotem, Wooding, & Aylor, 1984).

Como se ve la radiación genera efectos positivos al potenciar la fotosíntesis y ser un efectivo desinfectante, sin embargo por la reducción de la capa de ozono además de encontrarnos en una zona de riesgo ésta se ve aumentada particularmente la porción UV que constituye un factor de estrés abiótico.

Tal es el caso de semillas de fréjol negro expuestas a radiación UV-B por 20, 30 y 40 minutos en las cuales se redujo el porcentaje de germinación pero incrementó la velocidad de germinación (Shaukat, Farooq, Siddiqui, & Zaidi, 2013). Adicional a producir efectos adversos en el crecimiento de las plantas, se ha encontrado que se incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes como medio de protección frente al estrés oxidativo en plántulas de índigo verdadero sometidas a radiación UV-B (Ravindran, Indrajith, Pratheesh, Sanjiviraja, & Balakrishnan, 2010).

2.5 Actividad Enzimática

Ciertas enzimas cumplen roles asociados a procesos de defensa de la plantas frente a situaciones de estrés biótico, así tenemos que el metabolismo de las poliaminas así como la actividad de la peroxidasa tienen un papel importante en la resistencia del garbanzo frente a *Ascochyta rabiei*. (Angelini, Bragaloni, Federico, Infantino, & Porta-Puglia, 1993)

El estrés abiótico también genera procesos de respuesta en la planta como lo son cambios morfológicos y bioquímicos. En estudios realizados en quinua se ha asociado una alta actividad de la peroxidasa con la deposición de lignina lo cual produce un mayor grosor de la pared de las células epidérmicas. Esto puede ser visto como un medio defensa de las plantas frente a un incremento de la radiación UV-B (Hilal, y otros, 2003)

2.5.1 Peroxidasa

Son enzimas capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos catalizando la oxidación de una gran variedad de sustratos donantes de electrones como sustancias fenólicas, no fenólicas y aminas aromáticas (Duarte-Vázquez, García-Padilla, García-Almendárez, & Regalado, 2007). Están presentes en hongos, bacterias, algas, plantas y animales. Específicamente en las plantas pertenecen a la clase III de las peroxidases y están envueltas en algunos procesos importantes como la lignificación, suberización, metabolismo de auxinas, crecimiento del fruto, defensa contra los patógenos, metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las más importantes (Pandey, Awasthi, Singh, Tiwari, & Dwivedi, 2017).

Se ha visto como ante situaciones de estrés como la radiación UV se produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales pueden difundirse a través de las membranas celulares y causar daño celular ante lo cual las plantas activan sistemas de defensa entre los que se incluyen enzimas como la peroxidasa que remueven el peróxido de hidrógeno (Duarte-Vázquez, García-Padilla, García-Almendárez, & Regalado, 2007).

En ese sentido se irradiaron semillas de frejol de las variedades Sayad y Derakhshan y se encontró que la actividad de la peroxidasa en las hojas se incrementó con las dosis de irradiación UV (Peykarestan & Seify, 2012) Del mismo

modo se ha determinado el incremento de la peroxidasa y otras enzimas antioxidantes tras someter plántulas de *Phaseolus trilobus* por 4 días a radiación UV-B (Ravindran, Indrajith, Balakrishnan, Venkatesan, & Kulandaivelu, 2008)

Adicional a los estudios realizados relacionados con el estrés asociado a la radiación se ha estudiado los cambios morfológicos y fisiológicos producidos al someter a semillas de quinua a tres distintas dosis de radiación UV-B, y se determinó el incremento de la actividad enzimática de la peroxidasa relacionada al proceso de lignificación como una barrera de defensa (Hilal, y otros, 2003)

2.5.2 Proteasa

Constituyen un amplio grupo de enzimas encargadas de la hidrólisis de las proteínas, al incorporar una molécula de agua a los enlaces entre péptidos (Errasti, 2013). Son fundamentales para el normal desempeño fisiológico de las plantas al verse envueltas en diversos procesos metabólicos durante el ciclo de vida de la planta. Participan en la degradación de proteínas dañadas, innecesarias o desdobladas, para la posterior reutilización de los aminoácidos en el ensamblaje de nuevas proteínas, además son importantes en el proceso de degradación de las proteínas de reserva contenidas en las semillas, proceso que favorece el desarrollo de la plántula (Caffini, López, Natalucci, & Priolo, 1988).

La actividad proteolítica se ve incrementada cuando las células vegetales son expuestas a estrés oxidativo. Lo cual puede deberse a que las proteínas se ven oxidativamente modificadas por los radicales libres y estas proteínas serían degradadas por las proteasas (Palma, y otros, 2002).

Semillas de verdolaga fueron tratadas con 5 dosis de rayos UV, posteriormente fueron sembradas y se evaluó algunos parámetros entre los que se determinó que las proteasas incrementan su actividad para remover proteínas dañadas o anormales, además para procesos de reconstrucción como medio de respuesta frente a la radiación UV (Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012).

La determinación de la actividad de la proteasa puede ser una medida de evaluación temprana de la efectividad de las dosis de irradiación y se ha encontrado que la mayor actividad de la proteasa en semillas de algodón control seguidas de las que se sometieron a dos horas de radiación (Kalwar & Dahot, 2017).

2.5.3 Proteasoma

Las plantas al estar constantemente sometidas a condiciones ambientales que generan estrés como la salinidad, metales pesados, deficiencia de nutrientes, radiación, frío, sequía entre otros se ven obligadas a desarrollar sistemas que les permitan adaptarse a estos eventos, en ese sentido el Sistema Ubicuitina-Proteasoma (UPS) cumple un rol fundamental removiendo proteínas desdobladas o dañadas que se pueden acumular como resultado del estrés abiótico (Stone, 2014).

El UPS para cumplir con sus funciones efectúa dos etapas sucesivas, iniciando con la conjugación de la proteína a degradar con la ubiquitina (polipéptido de 76 aminoácidos), a continuación el proteasoma 26s reconocerá y degradará esta proteína “ubiquitinada”. El proteasoma es una macromolécula constituida por subunidades proteicas; una partícula central 20S donde ocurre la proteólisis y una reguladora 19S (Rocha-Sosa, 2013). Para que ocurra la ubiquitinación es necesaria la acción una enzima E1 (activadora), que traslada la ubiquitina a la enzima E2 (conjugadora) donde se forma un enlace tioester E2-ubiquitina; finalmente la enzima E3 (ligasa) interactúa con la molécula anterior permitiendo la conjugación de la ubiquitina con la proteína objetivo; este proceso puede ser repetido varias veces formando cadenas poliubiquitinadas (Stone, 2014).

Por lo anterior se entiende que una sobreexpresión de genes que codifican ubiquitinas resulta en una mayor tolerancia al estrés abiótico. Por otro lado el sistema UPS actúa regulando a los factores de transcripción; las ligasas E3 se orientan a los factores de transcripción para su degradación en el proteasoma (Stone, 2014).

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de investigación

3.1.1 Ubicación política

La investigación tuvo lugar en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, laboratorio de Fitopatología; ubicada en la Provincia: de Pichincha. Cantón: Rumiñahui. Parroquia: San Fernando. Hacienda El Prado.

3.1.2 Ubicación geográfica

La hacienda El Prado se ubica en las coordenadas geográficas a una longitud de $78^{\circ}24'44''\text{O}$ y una latitud de $0^{\circ}23'20''\text{S}$.



Figura 1 Fotografía lugar de investigación
(Google Maps, 2016)

3.1.3 Ubicación ecológica

La Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I se encuentra ubicada a una Altitud de 2745 msnm y presenta una temperatura media anual de 13.98°C ; en cuanto a la precipitación media anual se registran 1200 mm, de régimen bimodal y humedad relativa de 69,03%.

3.2 Materiales

3.2.1 Materiales para crecimiento de plántulas

Para la realización de esta investigación se empleó: semillas de chocho de la línea ECU- 722, una estufa casera (desarrollada por el Dr. Cesar Falconi), piranómetro, termómetro, data logger fundas plásticas, piloneras para la germinación de las semillas, tierra, cámara de crecimiento, libreta de campo, cámara fotográfica, cinta métrica.

3.2.2 Materiales de laboratorio

Se empleó nitrógeno líquido, autoclave, morteros, tubos falcon, balanza analítica, pipetas guantes, vasos de precipitación, micropipetas, tubos de microcentrífuga, centrifuga, espectrofotómetro.

3.2.3 Reactivos

Kits de detección de proteasoma, peroxidasa y proteasa.

3.3 Métodos

3.3.1 Solarización de semilla de chocho

Se empleó 400 semillas de chocho de la línea ECU-722, las cuales se colocaron en el interior de la estufa para solarización casera junto al termómetro de alta temperatura y el piranómetro conectados al data logger. La estufa tuvo estas características: dimensiones; 110 x 65 cm el área total, 100 x 50 cm la parte interna y 15 cm la altura de la caja interna. La estufa se cerró herméticamente y se expuso a las semillas por tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos entre las 11:00 y 12:00 del día dónde la radiación incide directamente.

3.3.2 Crecimiento de las plántulas

Posterior a la solarización, se sembraron las semillas en las piloneras con tierra de río: pomina: fibra de coco, en relación 1:1:1. El crecimiento se realizó en una cámara de crecimiento con 28°C de temperatura, 16 h de luminosidad y 90% de humedad relativa.

Se registró a diario la emergencia y se consideró emergida cuando los dos cotiledones fueron visibles. Se tomaron datos del porcentaje de germinación, número

de días para alcanzar el 50% de germinación, el tiempo medio de emergencia (MTG), de acuerdo a (Ellis & Roberts, 1981) con la siguiente ecuación.

$$MTG = \frac{\sum D^n}{\sum nt}$$

Donde D: es el número de días registrados desde el comienzo de la germinación, n: es el número de semillas germinadas en el día D, nt: número de plantas germinadas el día D.

A los 21 días se retiraron las plántulas de las piloneras y se midió la longitud de la raíz y la longitud de las plántulas.

3.3.3 Análisis enzimático

Para realizar el análisis de las enzimas se tomaron muestras compuestas de plántulas crecidas en cámara de crecimiento y se obtuvieron los extractos para lo cual se extrajo las hojas y se trituro con nitrógeno líquido. El producto resultante fue conservado a -80°C. A continuación se pesó 1g del triturado y se agregó 100µl de PBS más inhibidor de proteína, se trituro por una vez más con pistilo, se centrifugó a 14 000 rpm por 30 minutos a 4°C, finalmente se extrajo el sobrenadante y se colocó en tubos de microcentrifuga.

3.3.4 Actividad de peroxidasa

Se siguió el protocolo del kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase de invitrogen.

- Primero se disolvió el contenido del vial del reactivo rojo amplex en 60 µl de DMSO
- A continuación se preparó el buffer de reacción 1x añadiendo 4ml del buffer de reacción 5x a 16ml de agua desionizada,
- Luego se preparó la solución stock de peroxidasa de rábano 10U/ml disolviendo el contenido del vial de peroxidasa de rábano en 1,0 ml del buffer de reacción 1x,
- Posteriormente se preparó la solución de trabajo de peróxido de hidrógeno 20mM diluyendo 22,7µl de peróxido de hidrógeno en 977,2µl de buffer de reacción 1x.

- Se preparó el control positivo diluyendo de 10 U/ml a 2U/ml la solución stock de peroxidasa de rábano en el buffer de reacción 1x y el control negativo que es el buffer de reacción 1x
- Se preparó la solución madre mezclando 50µl del reactivo rojo preparado en el primer paso con 500µl de la solución de trabajo de peróxido de hidrógeno y 4,45ml del buffer de reacción 1x
- Se cargaron al plato de 96 pozos los controles las muestras y la solución madre para incubar por 30 minutos protegido de la luz y finalmente se midió la absorbancia a 560nm en el espectrofotómetro.

3.3.5 Proteasoma

Se empleó el kit Proteasome 20S Activity Assay de SIGMA-ALDRICH,

- Se preparó la solución stock proteosoma sustrato añadiendo 25 µl de DMSO al vial de sustrato proteosoma.
- A continuación se realizó la solución de carga del ensayo de proteasoma añadiendo 25 µl de la solución stock proteasoma sustrato a 10 ml del tampón de ensayo.
- Finalmente se añadió 100 µl de la solución de carga del ensayo de proteasoma con 10 µl de la muestra. Se incubó la mezcla a 37°C por una hora y se realizó la lectura en el espectrofotómetro.

3.3.6 Proteasa

Se siguió las instrucciones del kit Protease Fluorescent Detection de SIGMA-ALDRICH.

- Se mezcló 20 µl del tampón de incubación, 20 µl de FITC caseína sustrato y 10 µl de la muestra en un tubo de microcentrifuga.
- Se preparó las muestras control con 20 µl del tampón de incubación, 20 µl de FITC caseína sustrato y 10 µl de la muestra control (tripsina proteasa control) en un tubo de microcentrifuga.
- Luego se preparó las muestras blanco añadiendo 20 µl del tampón de incubación con 20 µl de FITC caseína sustrato y 10 µl de agua destilada en un tubo de microcentrifuga.

- Se dejó incubar a 37°C en oscuridad por 60 minutos, después de la incubación se añadió 150 µl de la solución de TCA a cada tubo de microcentrífuga, se mezcló e incubó en la oscuridad a 37°C por 30 minutos.
- Se centrifugó los tubos por 10 minutos a 10 000 rpm. y se extrajo 10 µl del sobrenadante y se añadió 1 ml del tampón de ensayo y después ser transferido 200µl de la mezcla a la microplaca de 96 pozos y registrar la fluorescencia en el espectrofotómetro.

3.4 Diseño Experimental

3.4.1 Factores a probar

El factor a probar en el estudio fue la radiación aplicada a las semillas de chocho de la línea ECU-722.

3.4.2 Tratamientos a comparar

Corresponden a los distintos tiempos de exposición de las semillas de chocho a la radiación solar con cuatro repeticiones

Tabla 1
Tratamientos aplicados a las semillas de chocho

Tratamiento	Detalle
T1	15 minutos de exposición
T2	30 minutos de exposición
T3	45 minutos de exposición
T4	60 minutos de exposición
T5	Sin exposición

3.4.3 Tipo de diseño

El proyecto seguirá el modelo de un diseño completamente al azar (DCA).

$$\gamma_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

γ_{ij} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i.

ϵ_{ij} = Error aleatorio, donde $\epsilon_{ij} = N(0, \sigma^2)$

3.4.4 Número de repeticiones

Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

3.4.5 Características de las Unidades Experimentales

Las unidades experimentales fueron las semillas de chocho de la línea ECU-722, en las cuales se aplicó los tratamientos.

3.4.6 Croquis del diseño

Se distribuyeron los tratamientos aleatoriamente.



Figura 2 Croquis del diseño

3.5. Análisis Estadístico

3.5.1. Esquema de Análisis de Varianza

Tabla 2
Análisis de varianza para el diseño experimental del estudio

Fuentes de variación	G. L
Total (n-1)	19
Tratamientos (t-1)	4
Error Experimental (n-1)- (t-1)	15

3.5.2 Coeficiente de variación

$$CV = \frac{\sqrt{CM E.Exp.}}{\bar{x}} * 100$$

3.5.3 Variables a Medir

3.5.3.1 Porcentaje de germinación

Se contabilizaron las semillas germinadas a los 7 días de la siembra y se determinó el porcentaje.

3.5.3.2 Número de días para alcanzar el 50% de emergencia

Se observó el tiempo que tarda cada tratamiento en alcanzar la mitad de las plantas germinadas.

3.5.3.3 Tiempo medio de emergencia

Se determinó el tiempo promedio que tarda cada tratamiento en emerger.

3.5.3.4 Longitud de la raíz

Se midió la longitud de la raíz de mayor longitud desde el cuello hasta el meristema apical.

3.5.3.5 Longitud de la plántula

Las plántulas se midieron desde el suelo hasta la yema apical.

3.5.3.6 Actividad de la peroxidasa

Las plántulas se procesaron de acuerdo a lo descrito anteriormente y se determinó la actividad de la peroxidasa de acuerdo al proceso indicado en el protocolo del kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase de invitrogen.

3.5.3.7 Actividad de la proteasa

Se midió la actividad de la enzima proteasa siguiendo los pasos del protocolo indicado en el kit Protease Fluorescent Detection de SIGMA-ALDRICH.

3.5.3.8 Actividad del Proteosoma

Al igual que en los anteriores casos se siguió los pasos del procedimiento señalado en el kit Proteasome 20S Activity Assay de SIGMA-ALDRICH.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Acumulación de radiación solar

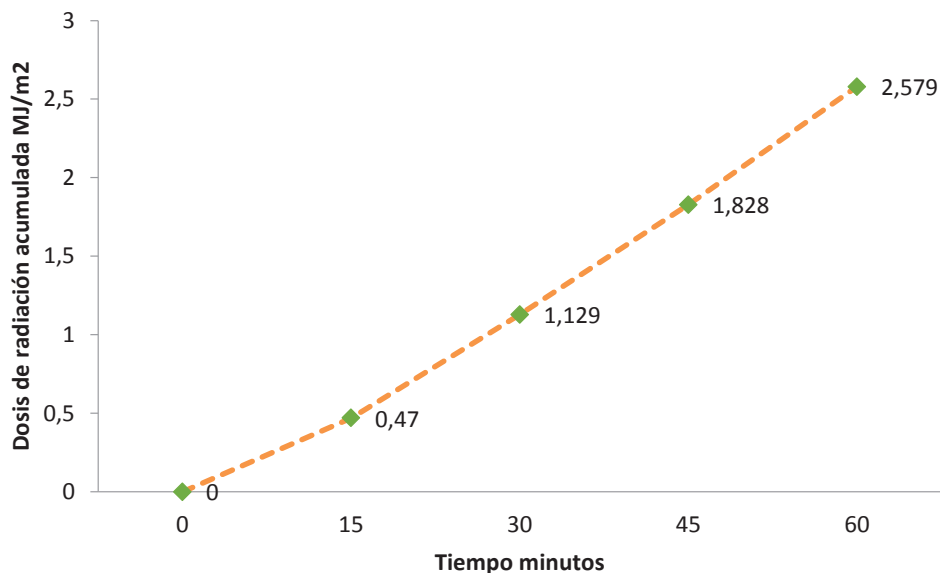


Figura 3 Radiación acumulada MJ.m-2.h-1 a los 15, 30, 45 y 60 minutos de exposición de la semilla en la estufa de fabricación casera, Hacienda El Prado (IASA 1), San Fernando, Ecuador.

La acumulación de radiación solar se incrementa con el tiempo de exposición de las semillas; así tenemos $0,47 \text{ MJ/m}^2$ a los 15 minutos, $1,129 \text{ MJ/m}^2$ a los 30 minutos, $1,828 \text{ MJ/m}^2$ a los 45 minutos y $2,579 \text{ MJ/m}^2$ de radiación acumulada a los 60 minutos de exposición.

4.1.2 Porcentaje de Germinación a los 7 días

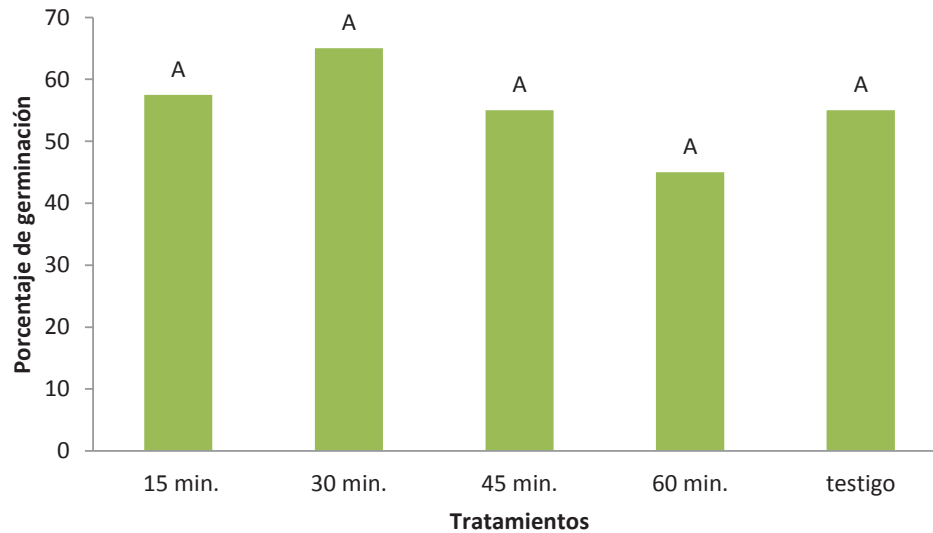


Figura 4 Efecto de la exposición a la radiación solar en el porcentaje de germinación de semilla ECU-722, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$

El porcentaje de germinación no se vio afectado por efecto de la radiación en las semillas tratadas. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,6798$).

4.1.3 Número de días para alcanzar el 50% de germinación en semillas pre tratadas con radiación solar

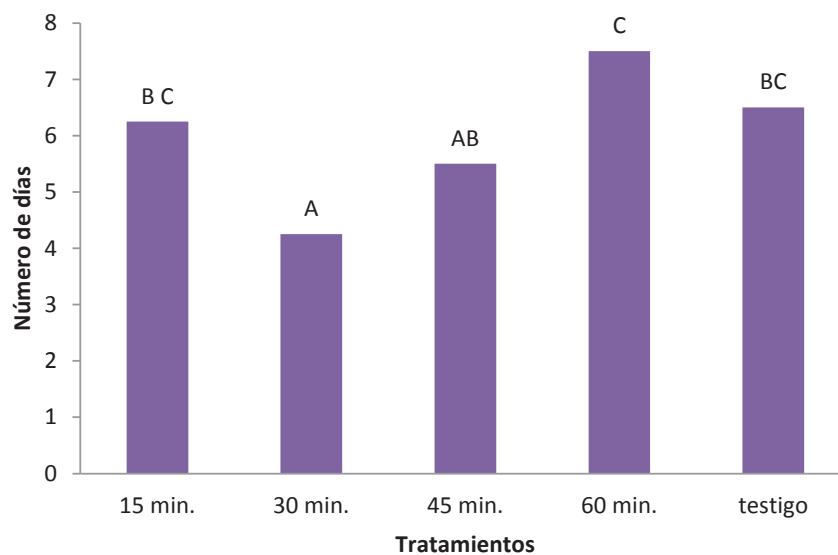


Figura 5 Efecto de la exposición a la radiación solar en el número de días para alcanzar el 50% de germinación de semilla ECU 722, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$.

El tratamiento por 30 minutos de radiación solar presentó el menor número de días para alcanzar el 50% de germinación con un promedio de cuatro, mientras que el testigo y el tratamiento de 60 minutos tardaron más días, encontrando diferencias significativas entre estos tratamientos ($F = 3,92$; $p = 0,0226$).

4.1.4 Tiempo medio de emergencia de plántulas de chocho tratado con radiación solar

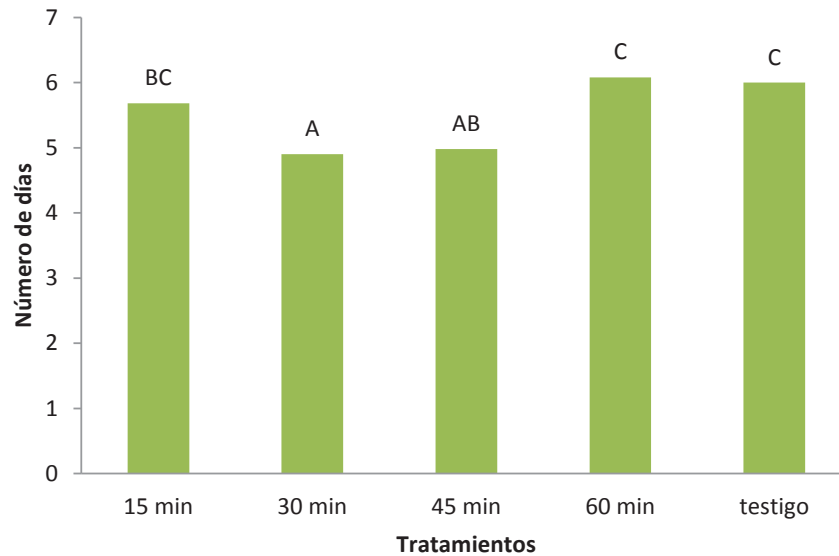


Figura 6 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en el tiempo medio de emergencia, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$.

Las semillas expuestas a 30 y 45 minutos de radiación mostraron los menores tiempos medios de emergencia 4,9 días y 4,98 días respectivamente, mientras que el testigo y los 60 minutos mostraron los tiempos más largos de emergencia con 6 días y 6,08 días respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento 2 con los tratamientos 1, 4 y 5 ($F = 5,15$; $p = 0,0082$).

4.1.5 Altura de las plántulas provenientes de semilla pre tratada con radiación solar

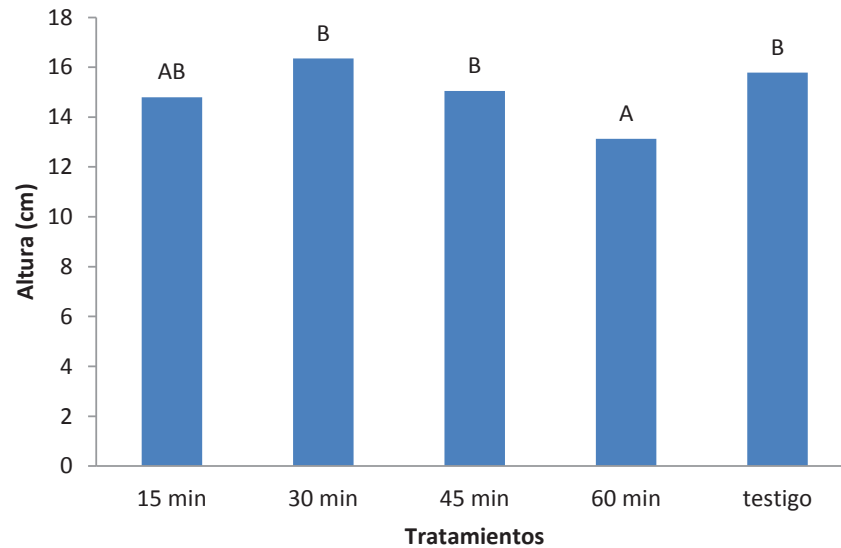


Figura 7 Efecto la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en la altura de las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$.

El tratamiento 4 (60 minutos) fue el que presentó plántulas con menor altura 13,13 cm, mientras que el testigo y los tratamientos de 30 y 45 min de exposición resultaron en plántulas con mayor altura. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos mencionados ($F = 4,31$; $p = 0,0161$).

4.1.6 Longitud de la raíz en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar

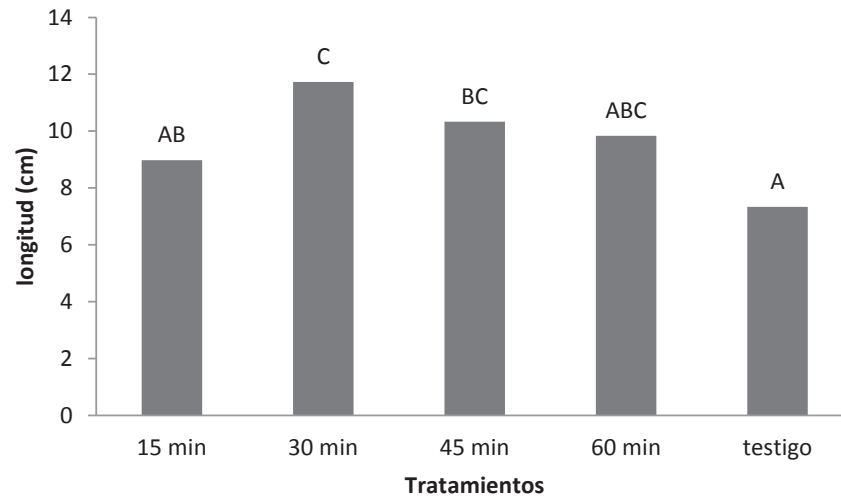


Figura 8 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU 722 en la longitud de la raíz de las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher $P < 0.05$.

El testigo presentó plántulas con raíces más cortas con 7,33 cm, mientras que el tratamiento 2 (30 minutos) fue el que dio lugar a raíces más largas con 11,73 cm. Se encontraron diferencias significativas entre estos dos tratamientos ($F = 3,28$; $p = 0,0405$).

4.1.7 Actividad del proteasoma 20s en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar

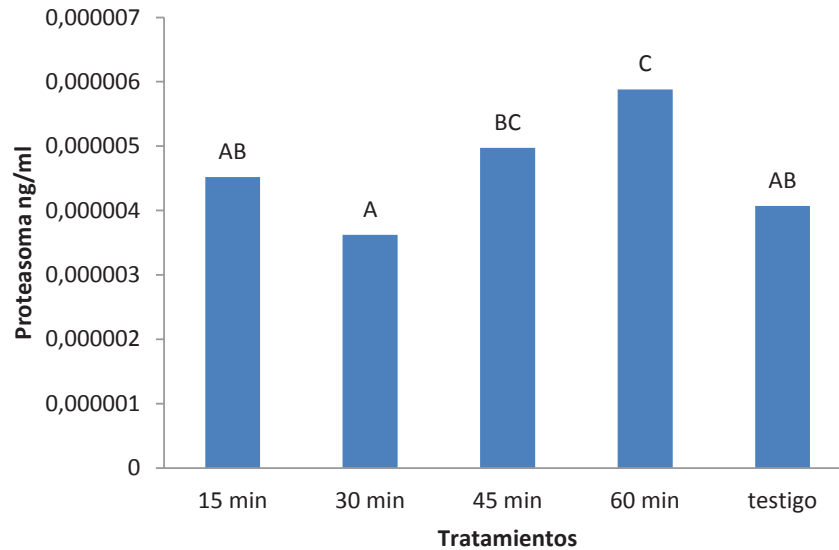


Figura 9 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU 722 en la actividad del proteasoma 20s de las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher

La actividad del proteasoma 20 s en el tratamiento de 60 minutos se vio aumentada en relación al testigo. Se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos ($F= 3,18$; $p= 0,0357$).

4.1.8 Actividad de la peroxidasa en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar

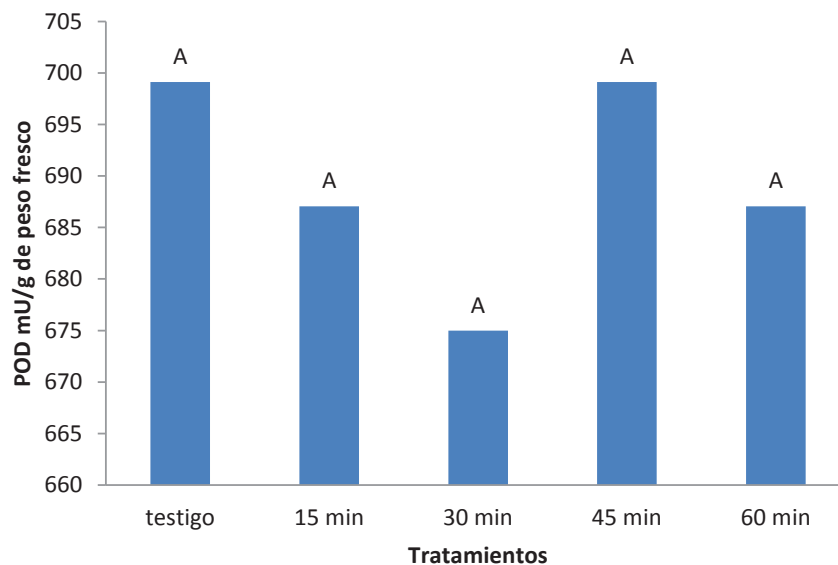


Figura 10 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en la actividad de la peroxidasa en las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher P

El testigo y el tratamiento de 45 minutos presentaron mayor actividad de la peroxidasa mientras que el tratamiento de 30 minutos tuvo la menor actividad de la enzima; de todas formas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F=0,58$; $p=0,6892$).

4.1.9 Actividad de las proteasa en plántulas provenientes de semilla tratada con radiación solar

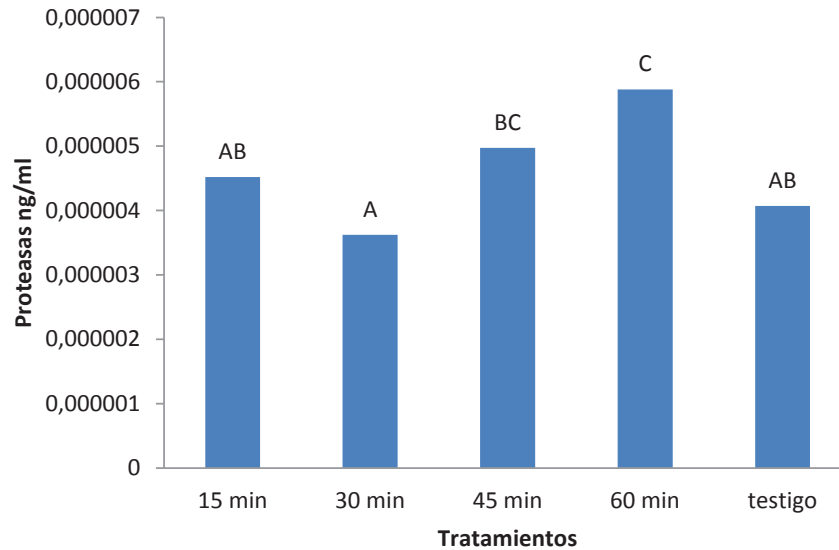


Figura 11 Efecto de la exposición a la radiación solar de semilla ECU-722 en la actividad de las proteasas en las plántulas, Hacienda El Prado (IASA1), San Fernando, Ecuador. Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes. Test LSD Fisher P

La actividad de las proteasa en el tratamiento de 60 minutos se vio aumentada en relación al testigo. Se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos ($F= 3,18$; $p= 0,0357$).

4.2. Discusión

La radiación acumulada en una hora entre las 11:00 y 12:00 horas obtenida en este experimento fue de $2,579 \text{ MJ/m}^2$ hecho que coincide con lo encontrado por (Mizubuti, Aylor, & Fry, 1999) quienes obtuvieron una radiación acumulada de 3 MJ/m^2 en el mismo periodo de tiempo.

En este trabajo se observó como la radiación acumulada no influyó en el porcentaje de germinación de las semillas; lo cual concuerda con (Noble, 2002) quien indica que la irradiación UV no afecta la germinación de col, rábano y agave. (Dai & Upadhyaya, 2002) señalan que un incremento en la radiación en la Tierra de hasta $11 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ no afecta el porcentaje de germinación. Por otro lado, se contrastan con lo encontrado por (Shaukat, Farooq, Siddiqui, & Zaidi, 2013) quienes señalan que el porcentaje de germinación de fréjol negro expuesto a radiación UV-B se vio afectado luego de exposiciones de 20, 30 y 40 minutos de exposición, probablemente debido al uso exclusivo de la porción UV-B en esa investigación.

En cuanto al número de días para alcanzar el 50% de germinación, al tratamiento de 30 minutos de exposición le tomó menos días para que las plántulas logren el 50% de germinación, por otro lado, al testigo y tratamiento de 60 minutos tardaron 6 y 7 días respectivamente. Si bien (Basra, Ashraf, Iqbal, Khaliq, & Ahmad, 2004). trabajaron con estrés calórico y no con radiación indican que el calor no afecta al tiempo para alcanzar el 50% de germinación en semillas de algodón y los tiempos encontrados fueron menores a los aquí registrados.

(Noble, 2002) menciona que la irradiación con UV resulta en un tiempo menor para la germinación en las semillas esto debido a que los fotones de la porción UV-B son más energéticos que los fotones de la porción visible de la luz por lo que tienen un mayor efecto en la superficie de las plantas. Esto último concuerda con los resultados aquí obtenidos en donde se observa como las semillas con exposiciones de 30 y 45 minutos obtuvieron un tiempo medio de emergencia menor que el testigo y las sometidas a 15 minutos. Coinciden también con (Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012) pues en su estudio el tiempo medio de emergencia aumentó con la disminución de la dosis de radiación. Sin embargo en este trabajo se observó que con 60 minutos de exposición el tiempo medio de emergencia fue el mayor de todos

los tratamientos, lo que sugiere que una alta dosis podría provocar un efecto contrario.

El tratamiento de 60 minutos afectó a la altura de las plántulas estos resultados contrastan con lo encontrado por (Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012; Shaukat, Farooq, Siddiqui, & Zaidi, 2013) quienes reportaron que el crecimiento en las plántulas se vio afectado por todos los periodos de exposición a la radiación UV-B; de todas formas también se indica que la respuesta de las plantas a la radiación UV-B varía de acuerdo a la especie; en ese sentido el chocho podría mostrar una mejor respuesta al ser una planta adaptada a los Andes ecuatorianos, donde la radiación es más intensa. (Dai & Upadhyaya, 2002) no encontraron afectación en el crecimiento de la planta cuando las semillas recibieron 4 y 7 $\text{Kj m}^{-2} \text{d}^{-1}$ mientras que cuando recibieron 11 $\text{Kj m}^{-2} \text{d}^{-1}$ si se produjo afectación; sugieren que al estar los tallos expuestos constantemente a la radiación estos podrían desarrollar un mecanismo de defensa contra los efectos dañinos de ésta.

El largo de la raíz fue superior en los tratamientos de 30 y 45 minutos mientras que las raíces de las plántulas testigo fueron las más cortas, estos resultados difieren con los encontrados por (Noble, 2002; Dai & Upadhyaya, 2002; Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012; Shaukat, Farooq, Siddiqui, & Zaidi, 2013; Ravindran, Indrajith, Pratheesh, Sanjiviraja, & Balakrishnan, 2010) quienes observaron que el largo de las raíces decreció bajo todas las dosis y tiempos de exposición a la radiación UV-B. Por otro lado (Neelamegam & Sutha, 2015) observaron que la radiación UV-C favoreció el crecimiento de las raíces incluso hasta con 60 minutos de exposición.

Se encontró que la actividad del proteasoma 20s se vio incrementada cuando las semillas fueron tratadas con 60 minutos de exposición a la radiación lo cual puede sugerir que a ésta dosis de radiación el sistema ubicuitina proteasoma cumple con el rol de defensa de la planta ante el estrés como lo encontraron (Pena, Pasquini, Tomaro, & Gallego, 2007). sin embargo mencionan que existe un límite en la respuesta del proteasoma frente al estrés producido por cadmio pues encontraron que ante dosis bajas de cadmio la actividad del proteasoma 20s se vio incrementada pero la dosis más alta de cadmio por el contrario inhibió la actividad del proteasoma.

La radiación solar no afectó a la actividad de la peroxidasa en ningún tratamiento contrastando con lo encontrado por (Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012; Ravindran, Indrajith, Balakrishnan, Venkatesan, & Kulandaivelu, 2008; Peykarestan & Seify, 2012; Sharma, Anand, & S., 1998; Ravindran, Indrajith, Pratheesh, Sanjiviraja, & Balakrishnan, 2010) que observaron incremento en la actividad de la peroxidasa tras someter al material vegetal a la radiación UV-B como mecanismo de defensa frente a la formación de radicales libres producidos por el estrés generado; la diferencia probablemente radica en que en las investigaciones mencionadas las semillas o las plántulas fueron sometidas a radiación exclusivamente UV-B a través de lámparas por períodos más largos de tiempo.

Se encontró que la actividad de las proteasas se vio incrementada con los 60 minutos de tratamiento en relación al testigo. (Peykarestan & Seify, 2012; Peykarestan B. , Seify, Fasei, & Hatim, 2012) concluyen que una alta actividad de las proteasas indica degradación de proteínas por parte de éstas enzimas para de esta forma tener disponibles nuevos aminoácidos para la corrección de proteínas alteradas. (Kalwar & Dahot, 2017) mencionan que la radiación UV afectó la actividad de la proteasa y juegan un papel importante en la reparación de proteínas dañadas.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Los parámetros morfológicos de crecimiento y la respuesta fisiológica positiva de las enzimas antioxidantes en plántulas provenientes de semilla pretratada con radiación solar, influyeron de manera positiva bloqueando la expresión de los síntomas de antracnosis.

La radiación acumulada no influyó en el porcentaje de germinación normal de las semillas pretratadas con radiación solar.

En casi todos los tratamientos incluyendo al testigo se obtuvo una respuesta de crecimiento similar en altura, excepto en el pretratamiento con 60 min de exposición en el cual el crecimiento fue menor.

Con excepción del testigo, el pretratamiento de semillas irradiadas tuvo un efecto positivo sobre la longitud de la raíz.

La actividad de la peroxidasa no se vio afectada por la radiación solar, por el contrario la actividad de la proteasa y proteasoma 20s se vio aumentada con la mayor dosis de radiación solar como mecanismo de respuesta positiva frente al estrés abiótico.

5.2 Recomendaciones

Para establecer el umbral de radiación que el chocho puede tolerar, es importante incluir más genotipos, tiempos de exposición y mayor número de repeticiones para corroborar los resultados obtenidos en la presente investigación.

Se recomienda analizar otros tipos de enzimas antioxidantes, así como también incluir indicadores de estrés oxidativo alternativos.

5.3 Bibliografía

- Aizaga, J. (2015). Efecto de distintos tiempos de exposición a la radiación solar para reducir infección de antracosis (*Colletotrichum acutatum*) en semilla de chocho (*Lupinus mutabilis*). Sangolquí, Ecuador.
- Angelini, R., Bragaloni, M., Federico, R., Infantino, A., & Porta-Puglia, A. (1993). Involvement of Polyamines, Diamine Oxidase y Peroxidase in Resistance of Chickpea to *Ascochyta rabiei*. *Plant Physiology*, 704-709.
- Aylor, D., & Sanogo, S. (1997). Germinability of *Venturia inaequalis* Conidia Exposed to Sunlight. *PHYTOPATHOLOGY*, 628-33.
- Basra, S., Ashraf, M., Iqbal, N., Khaliq, A., & Ahmad, R. (2004). Physiological and biochemical aspects of pre-sowing heat stress on cottonseed. *Seed Sci. & Technol*, 837-46.
- Borek, S., Pukacka, S., Michalski, K., & Ratajczak, L. (2009). Lipid and protein accumulation in developing seeds of three Lupine species: *Lupinus luteus* L, *Lupinus albus* L and *Lupinus mutabilis* Sweet. *Journal of Experimental Botany*, 3453-3466.
- Caffini, N., López, L., Natalucci, C., & Priolo, N. (1988). Proteasas de Plantas Superiores. Características Generales, Rol Fisiológico y Aplicaciones. *Acta farmacéutica bonaerense*, 195-213.
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2001). *El cultivo de Chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*, *Fitonutrición, Enfermedades y Plagas, en el Ecuador*. Quito: Tecnigrav.
- Caldwell, M., & Flint, S. (1994). Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change*, 375-394.

- Campillo, C., Fortes, R., & Del Hénar, M. (2012). Solar Radiation Effect on Crop Production. *InTech*.
- Castañeda, M. (1988). Estudio comparativo de diez variedades de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) conducidas en dos ambientes de la Sierra norte y centro del Perú (Tesis de pregrado). Lima, Perú.
- Dai, Q., & Upadhyaya, M. (2002). Seed germination and seedling growth response of selected weedy species to ultraviolet-B radiation. *Weed Science*, 611-615.
- Duarte-Vázquez, M., García-Padilla, S., García-Almendárez, B., & Regalado, C. (2007). Purification of Natural Plant Peroxidases and their Physiological Roles. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 18-31.
- Ellis, R., & Roberts, E. (1981). The quantification of aging and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology*, 373-409.
- EPA. (2010). *UV Radiation*. Obtenido de <https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/uvradiation.pdf>
- Errasti, M. (2013). Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina. (Tesis doctoral). La Plata, Argentina.
- Falconí. (2012). *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance. (Tesis doctoral). Wagenigen University, Países Bajos.
- Falconí, C., Visser, R., & van Heusden, A. (2013). Phenotypic, Molecular, and Pathological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Associated with Andean Lupine and Tamarillo in the Ecuadorian Andes. *The American Phytopathological Society*, 819-827.

- Gill, S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 909-930.
- Google Maps. (2016). *Mapa del Instituto Agropecuario Superior Andino*. Obtenido de <https://www.google.com.ec/maps/place/IASA/@-0.3867899,78.4172305,3848m/data=!3m1!1e3!4m8!1m2!2m1!1siasa!3m4!1s0x0:0xc6c8b2bb6c026969!8m2!3d-0.3856344!4d-78.416419>
- Gross, R. (1982). El cultivo y la utilización del tarwi: *Lupinus mutabilis* sweet. *primera ed. California*, Organización de las naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Hernández, J., Escobar, I., & Castilla, N. (2001). La radiación solar en invernaderos Mediterráneos. *Caja rural de Granada*, 36.
- Hilal, M., Parrado, M., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E., Prado, F. (2003). Epidermal Lignin Deposition in Quinoa Cotyledons in Response to UV-B Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 205-210.
- Insunza, B. (2006). Meteorología Descriptiva. Universidad de Concepción. *Departamento de Geofísica*, Concepción, Chile.
- Jacobsen, S., & Mujica, A. (2006). *El tarwi (Lupinus mutabilis Sweet) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales*. La Paz: 458-482.
- Jacobsen, S., & Mujica, A. (2012). *El tarwi (Lupinus mutabilis Sweet.) y sus parientes silvestres*. primera ed: 458-482.
- Jarrín. (2014). Reducción de la infección de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) en semilla de cinco cultivares de chocho (*Lupinus mutabilis*) por efecto del

calor solar. (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas. Sangolquí., Ecuador.

Jarrín, A. (2017). Efecto de la radiación solar en infecciones de antracnosis (*C. acutatum*) en semilla y en el posterior rendimiento del chocho. (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas Sangolquí, Ecuador.

Kalwar, K., & Dahot, M. (2017). Effect of induced mutation by UV radiation on cotton growth, seeds and protease activity. *Pak. J. Biotechnol*, 105-107.

Liu, B., Liu, X., Li, Y., & Herbert, S. (2013). Effects of enhanced UV-B radiation on seed growth characteristics and yield components in soybean. *Field Crops Research*, 158-163.

Mizubuti, E., Aylor, D., & Fry, W. E. (1999). Survival of *Phytophthora infestans* Sporangia Exposed to Solar Radiation. *PHYTOPATHOLOGY*, 78-84.

Moreno, K. (2008). Estudio sobre las características nutricionales del chocho y propuesta gastronómica.(Tesis de pregrado). Quito, Ecuador.

Neelamegam, R., & Sutha, T. (2015). UV-C Irradiation Effect on Seed Germination, Seedling Growth and Productivity of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Int.J.Curr .Microbiol.App.Sci*, 430-443.

Noble, R. E. (2002). Effects of UV-irradiation on seed germination. *The Science of the Total Environment*, 173-176.

Palma, J., Sandalio, L., Corpas, F., Romero-Puertas, M., Mc Carthy, I., & del Río, L. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.*, 521-530.

- Pandey, V., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem Anal Biochem*, 3-8.
- Pena, L., Pasquini, L., Tomaro, M., & Gallego, S. (2007). 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*, 139-146.
- Peralta, E. N., Mazón, Á., Murillo, M., Rivera, D., Rodríguez, L., Lomas, C., & Monar. (2012). Manual Agrícola de Granos andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción. Programa Nacional de Leguminosas y Granos andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador.
- 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*, 92-102.
- Peykarestan, B., Seify, M., Fasei, M., & Hatim, M. (2012). UV Irradiation Effects on Seed Germination and Growth, Protein Content, Peroxidase and Protease Activity in *Portulaca grandiflora* and *Portulaca oleracea*. *World Applied Sciences Journal*, 802-808.
- Pinto, L., & Tiaguaro, C. (2012). Caracterización patológica y molecular de la antracnosis del tomate de árbol (*Solanum betacea*) y chocho (*Lupinus mutabilis*). (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas. Sangolquí, Ecuador.
- Ravindran, K., Indrajith, A., Balakrishnan, B., Venkatesan, K., & Kulandaivelu, G. (2008). Determination of defense mechanism in *Phaseolus Trilobus* Ait.

seedlings treated under uv-b radiation. *African Crop Science Journal*, 111-118.

- Ravindran, K., Indrajith, A., Pratheesh, P., Sanjiviraja, K., & Balakrishnan, V. (2010). Effect of ultraviolet-B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L. seedlings. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 226-232.
- Rivadeneira, M. (2012). *Buenas tareas*. Obtenido de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Manejo-De-LupinusMutabilis/6830893.html>
- Rocha-Sosa, M. (2013). El sistema ubicuitina/proteasoma en la interacción planta-patógeno. *TIP*, 121-131.
- Rotem, J., Wooding, B., & Aylor, D. (1984). The Role of Solar Radiation, Especially Ultraviolet, in the Mortality of Fungal Spores. *PHYTOPATOLOGY*, 510-514.
- Sharma, P., Anand, P., & S., S. (1998). Oxidative damage and changes in activities of antioxidant enzymes in wheat seedlings exposed to ultraviolet-B radiation. *CURRENT SCIENCE*, 359-366.
- Shaukat, S., Farooq, M., Siddiqui, M., & Zaidi, S. (2013). Effect of enhanced UV-B radiation on germination, seedling growth and biochemical responses of *vigna mungo* (l.) hepper. *Pak. J. Bot*, 779-785.
- Shetta, N., & Areaf, I. (2009). Impact of Ultraviolet-C Radiation on seed Germination and chlorophyll Concentration of some Woody trees grown in Saudi Arabia. *Alex.J. Agric. Res*, 1-20.
- Stone, S. (2014). The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Frontier in plant sciences*, 1-11.

- Tapia, M., & Fries, A. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. primera ed. Lima, Perú.
- Terán, W. (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*). (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas. Sangolquí., Ecuador.
- Thomas, G., & Sweetingham, M. (2003). Fungicide seed treatments reduce seed transmission and severity of lupin anthranose caused by *Colletotrichum gloeosporoides*. *Australasian Plant Pathology*, 39-47.
- Wald, L. (2007). Solar radiation energy (fundamentals). *Encyclopedia of Life Support Systems*, 1-10.