

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación de la resistencia al hongo necrótrofo *Alternaria* sp en brócoli  
(*Brassica oleracea* var *italica*) en dos sistemas de cultivo**

**Carlos Alejandro Pazmiño Guevara**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 17 de Diciembre del 2021

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Evaluación de la resistencia al hongo necrótrofo *Alternaria* sp en brócoli en  
dos sistemas de cultivo**

**Carlos Alejandro Pazmiño Guevara**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León Reyes, PhD**

Quito, 17 de Diciembre del 2021

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Carlos Alejandro Pazmiño Guevara

Código: 00202750

Cédula de identidad: 1719148809

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre del 2021

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) es una hortaliza de alto interés tanto nutricional como socioeconómico en Ecuador y alrededor del mundo. Esta hortaliza se ve afectada anualmente por el hongo necrótrofo *Alternaria* sp el cual produce manchas oscuras y claras en las hojas infectadas; dichas manchas oscuras son resultado de la necrosis o muerte de tejidos llevada a cabo por este hongo, mientras que las manchas claras se dan como resultado de la clorosis derivada de toxinas o sustancias químicas liberadas por el hongo durante el proceso infectivo. Además, se ha visto que las infecciones fúngicas son comunes tanto en sistemas de cultivo tradicionales como en sistemas de cultivo alternativos como lo es la hidroponía siendo así un problema recurrente que afecta al rendimiento y valor comercial de dichos cultivos. Es por esto, que se busca evaluar la resistencia al hongo necrótrofo *Alternaria* sp en brócoli en dos sistemas de cultivo siendo estos suelo (sistema tradicional) e hidroponía (sistema alternativo). Para esto, primeramente, se realizó una cuantificación de la biomasa presente tanto en el suelo con un sustrato nativo y otro agrícola como en la hidroponía; esto se realizó mediante diluciones seriadas de 1 g de cada suelo y 10 ml de solución nutritiva las cuales fueron sembradas por la técnica de extensión en placa en medios para cuantificar bacterias totales, bacterias solubilizadoras de nutrientes y grupos de interés; así como hongos totales y *Trichodermas*. Posteriormente, se establecieron cultivos de brócoli en los tres sustratos antes mencionados en donde se evaluó el crecimiento mediante la técnica de peso fresco. Finalmente, se procedió a estandarizar el bioensayo identificando la cepa de *Alternaria* sp con mayor virulencia la cual fue utilizada posteriormente para determinar la severidad de infección observada en las plantas de 1 mes de edad cultivadas en los distintos sustratos. En conclusión, se evidenció una mayor cantidad de microorganismos en los sustratos agrícola y nativo en comparación con el sistema hidropónico. Por otro lado, se observó un mayor crecimiento en el sistema hidropónico presentando una media de 3,37 gramos frente a sus contrapartes entre 1,75 y 2,7 g. Finalmente, se determinó que el suelo nativo presentaba una mayor severidad de infección mientras que el suelo agrícola presentaba la menor severidad de los tres sustratos siendo el suelo nativo el más afectado.

**Palabras clave:** *Brassica oleracea* var. *Italica*, *Alternaria* sp, Suelo, Hidroponía, Cuantificación Microbiológica, Severidad de Infección

## ABSTRACT

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) is a vegetable of high nutritional and socioeconomic value not only in Ecuador but worldwide. This vegetable is highly affected yearly by the necrotrophic fungi *Alternaria* sp causing dark and light spots among the infected leaves. Those dark spots are a result of the necrosis or tissue death generated as a result of *Alternaria* infection meanwhile the light spots are a result of toxigenic and chemical substances secreted by the fungi during the infective process. However, fungal infections have been reported not only in traditional soil based agriculture but also in new agricultural techniques like hydroponics systems affecting crop yield and commercial value. Due to the problem stated, the aim of this study is to evaluate resistance to the necrotrophic fungi *Alternaria* sp in broccoli in two crops systems (traditional- soil and hydroponics). In order to evaluate that we first did a microbiological quantification in samples from agricultural and native soil, and hydroponics. This was achieved by serial dilutions starting from 1 g of each soil sample and 10 ml of nutritive solution. Also, the dilutions obtained were cultured by plate extension of 100 microliters. After that, we established crops in both systems using the three substrates previously mentioned (Native, agricultural and hydroponics). Later on, after a month of growth all the plants were fresh weight measured in order to determine the growth media among each substrate. Finally, we standardized the bioassay in which we identified the most virulent strain of *Alternaria* sp which was later on utilized to determine the severity of infection in 1 month old plants which have grown in each substrate. As a conclusion, it was shown greater microbiological presence in agricultural and native soil over hydroponics. Also, it was determined that plants cultivated in the hydroponics system presented greater weights with a media of 3,37 g than soil cultivated plants with medias from 1,75 to 2,7 g. However, in the severity of infection we determined that the greater severity was present in native soil meanwhile lesser severity was observed on agricultural soil.

**Key words:** *Brassica oleracea* var. *Italica*, *Alternaria* sp, Soil, Hydroponics, Microbiological quantification, Infection severity

**TABLA DE CONTENIDO**

1.	Introducción .....	11
2.	Métodos.....	15
2.1	Cuantificación de grupos microbiológicos entre sistemas de cultivo .....	15
2.2	Establecimiento de sistemas de cultivo.....	15
2.3	Análisis del crecimiento por peso fresco .....	16
2.4	Aislamiento del hongo necrótrofo <i>Alternaria</i> sp .....	16
2.5	Bioensayos .....	17
3.	Resultados .....	18
3.1	Cuantificación de grupos microbiológicos entre sustratos .....	18
3.4	Bioensayos .....	20
4.	Discusión.....	22
4.1	Cuantificación de grupos microbiológicos entre sistemas de cultivo .....	22
4.2	Análisis del crecimiento por peso fresco .....	23
4.3	Bioensayo de severidad de infección en sustratos .....	24
5.	Conclusiones .....	26
6.	Tablas.....	27
7.	Figuras.....	30
8.	Referencias bibliográficas.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo para cuantificación bacteriana.....	26
Tabla 2. Medios de cultivo para cuantificación fúngica.....	27
Tabla 3. Análisis de chi cuadrado pareado en severidad de infección.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cuantificación microbiológica de bacterias y hongos en suelo Nativo, Agrícola e hidroponía. .....	29
Figura 2. Establecimiento de cultivos en suelo Nativo, Agrícola e hidroponía.....	31
Figura 3. Crecimiento cuantificado en función del peso fresco de la parte aérea de las plantas cultivadas en los distintos tratamientos. ....	32
Figura 4. Aislado y microscopia de <i>Alternaria</i> sp.....	34
Figura 5. Bioensayo de Potencial de infección .....	36
Figura 6. Severidad evidenciada en los distintos tratamientos.....	38

**ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo 1: Elaboración de Medios de cultivo.....	42
Anexo 2: Ejemplos de cultivos .....	45
Anexo 3: Aislamiento de <i>Alternaria sp</i> .....	47

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas generan pérdidas de cultivos alrededor del mundo debido a que al darse una infección fúngica en una planta la misma pierde valor ya sea este económico o nutricional como resultado de las afecciones en forma de cambios en coloración, textura o sabor evidenciados como resultado de la propagación de la infección en el tejido vegetal (Liu, et al., 2009). En relación a esto, es importante mencionar que existen dos tipos de hongos de interés en relación a esta investigación: Hongos Necrótrofos y Hongos biótrofos.

Los hongos biótrofos se caracterizan por alimentarse de un hospedero vivo mediante la producción de compuestos químicos capaces de modificar la permeabilidad de las membranas vegetales facilitando así la salida de compuestos de interés necesarios para el desarrollo del hongo como azúcares o aminoácidos. Por otro lado, los hongos Necrótrofos se caracterizan por su alta virulencia causando así la muerte del tejido vegetal del hospedero mediante toxinas o químicos que causan la ruptura del tejido vegetal y la posterior liberación de nutrientes los cuales son posteriormente absorbidos por el hongo (Cubas, 2007). Así mismo, se ha visto que los hongos Necrótrofos afectan principalmente plantas capaces de desarrollarse en la oscuridad puesto que muestran un mayor crecimiento en la oscuridad frente a la luz; mientras que los hongos biótrofos prefieren plantas ubicadas en la luz mostrando mayor crecimiento en plantas correctamente iluminadas frente a la oscuridad (García, et al., 2017). A su vez, dentro de cada grupo antes mencionado es importante recalcar la presencia de hongos de amplio espectro de hospederos y de hongos de hospederos específicos. Los hongos de amplios espectro de hospederos afectan a un amplio rango de plantas y producen Elicitores o metabolitos que facilitan su infección; mientras que los hongos específicos afectan a una especie vegetal específica y producen sustancias químicas específicas para dicha especie (Rivera y Wright, 2020).

Un hongo necrótrofo reconocido alrededor del mundo por su afectación generalista a un grupo considerable de especies y familias de plantas es la *Alternaria* sp. *Alternaria* sp es un género de hongos cosmopolita que afecta varios sistemas de cultivo en el que se pueden encontrar especies saprófitas (alimentación de materia orgánica muerta), endófitas (en el interior de la planta) y patógenas (causante de enfermedades) las cuales afectan una amplia variedad de especies vegetales (Woudenberg, et al., 2013). La mayoría de las especies de *Alternaria* relacionadas a infecciones tanto en humanos como en plantas pertenecen

a *Alternaria* sección *Alternaria* los cuales se caracterizan por la presencia de esporas pequeñas, conidias concatenadas y coloración oscura al crecer en medios de cultivo (Woudenberg, et al., 2015). Cabe recalcar que de manera general *Alternaria* es un hongo saprófito; sin embargo, a lo largo de los años a desarrollado o adquirido capacidades patógenas que le permiten infectar un rango amplio de huéspedes estas capacidades hacen referencia principalmente a la capacidad de producir melanina (relacionada al desarrollo de conidias y a la virulencia del hongo) en las esporas y producir toxinas específicas para cada hospedador. Además, *Alternaria* generalmente es un patógeno foliar que causa una destrucción de los tejidos vegetales como resultado de la pérdida de capacidad fotosintética dando lugar al crecimiento de lesiones necróticas en donde el hongo se encuentra en el centro de la lesión rodeado por un halo de clorosis resultado de las toxinas liberadas por el hongo en el tejido vegetal (Thomma, 2003).

Por otro lado, uno de los cultivos o especies vegetales afectados anualmente por este patógeno es el brócoli. El brócoli *Brassica oleracea* var. *Italica* es una planta perteneciente a la familia de las *Brassicaceae* de gran importancia socioeconómica y nutricional alrededor del mundo. En relación a su valor nutricional el brócoli es una planta rica en vitamina C, fibra, y nutrientes los cuales se considera cuentan con aplicaciones anticancerígenas y de modulador inmunitario (Toledo, 2003). A nivel mundial el brócoli es una planta de gran impacto económico por lo cual su producción ha venido en aumento considerable a lo largo de los años evidenciando un cultivo de brócoli mundial superior a las 20 millones de toneladas anuales (Kabakeris, 2018). Es por esto que países como China (10 millones de toneladas anuales), India (8 millones de toneladas anuales), USA (1 millón de toneladas anuales), entre otros; verían pérdidas considerables en caso de una infección fúngica masiva en sus cultivos (FAO, 2020).

En el Ecuador el sector agrícola representa un eje fundamental de la economía con alrededor de un millón y medio de hectáreas sembradas por cultivos permanentes, sumado de aproximadamente un millón extra de hectáreas relacionadas a cultivos transitorios (INEC, 2021). En cuanto al brócoli, durante el período de los años 2017 – 2019 se observó un promedio de siembra de 9 mil hectáreas anuales siendo esta mayoritariamente realizada en la provincia de Cotopaxi donde el clima y la disponibilidad de luz favorecen su crecimiento (Sánchez, et al., 2020). Además, cabe mencionar que se ha observado una tendencia creciente de cultivo de esta hortaliza de alrededor del 22% desde el año 2003 representando alrededor de 50 millones de dólares

anuales para la industria agrícola ecuatoriana (Cevallos, 2010). Por otro lado, su importancia en la importación es relevante representando alrededor de 70 mil dólares anuales en un mercado con un crecimiento del 8% anual permitiéndole ser el país número uno en cuanto a exportación de esta hortaliza dentro de Sudamérica (Sánchez, et al., 2020).

Debido a la relevancia de las infecciones fúngicas en cultivos alrededor del mundo se ha estudiado históricamente formas de controlar dicha problemática. Para esto, se han identificado dos posibles formas de control: El control químico el cual se basa en el uso de fungicidas para limitar o inhibir el crecimiento del patógeno mediante sustancias como el ácido protocatéquico. Actualmente, el control químico es el método de control más utilizado por ser considerado económico y eficaz; sin embargo, su utilización desmedida presenta afectaciones a la salud y al medio ambiente (Villa, et al., 2014). Por otro lado, se ha planteado el uso del control microbiológico o biocontrol como una solución alternativa en la que se busca utilizar microorganismos bacterianos o fúngicos como cepas inductoras de resistencia, antagónicas a patógenos o preactivadoras de la inmunidad vegetal favoreciendo la inhibición o el control de la infección. Además, se ha visto que comunidades microbiológicas brindan posibles beneficios al interactuar con la planta y favorecen su nutrición al fijar nutrientes como el nitrógeno, solubilizar nutrientes insolubles como el fosfato, entre otros (Rashad y Moussa, 2019).

En el caso del suelo se han evidenciado posibles organismos microbiológicos con implicaciones de resistencia o disminución de severidad. Estos microorganismos por lo general forman sistemas complejos a manera de consorcios en donde se benefician el uno del otro. Cabe recalcar que es importante determinar la microbioma presente en el suelo puesto que tanto bacterias como hongos pueden cumplir papeles antagonistas a patógenos favoreciendo así la supresión de enfermedades en cultivos (Heydari y Pessarakli, 2010). Lo antes mencionado puede ser evidenciado en el estudio de Tarabily y colaboradores en donde analizan los efectos de levaduras como promotores de crecimiento y a manera de biocontrol para patógenos de origen fúngico en donde se observó que las levaduras cuentan con capacidad de suprimir infecciones causadas por patógenos fúngicos en plantas (Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

Finalmente, las infecciones fúngicas no se remiten únicamente al suelo, puesto que también se han observado infecciones fúngicas en otros sistemas de cultivo como lo es la hidroponía. Un ejemplo de esto es

estudiado por Chairin y colaboradores en el año 2017 en donde se observa que cultivos de lechuga en hidroponía presentaban una enfermedad caracterizada por la presencia de manchas en las hojas dando lugar a la identificación de *Corynespora cassiicola* como el patógeno causal de la afectación (Chairin, et al., 2017).

Cabe mencionar que la hidroponía es un sistema de cultivo carente de sustrato en el que las plantas crecen en un medio inerte que contiene una solución nutritiva que provee de minerales y nutrientes requeridos para el desarrollo de la planta. Además, este sistema presenta una ventaja puesto que puede ser automatizado gracias a la utilización de relojes programables y bombas que permitirán una constante recirculación de nutrientes favoreciendo una nutrición constante, regulada y equitativa entre cultivos (Resh, 2012). Por otro lado, la hidroponía NFT hace referencia a la utilización de un sistema carente de suelo basado en tubos con perforaciones en donde se colocarán las plantas dando lugar a una especie de canal por donde circulará la solución nutritiva. Este tipo de hidroponía presenta beneficios como lo son un mayor rendimiento productivo y un menor uso de recursos naturales; sin embargo, presenta limitaciones como lo son la necesidad de controlar adecuadamente factores como el pH y la temperatura y un microbioma reducido (Crisnapati, et al., 2017). Es importante mencionar que se recomienda principalmente su utilización para hortalizas como las lechugas y vegetales que presenten ciclos de crecimiento corto; esto debido a que hortalizas con ciclos de crecimientos largos formarán un gran sistema radicular generando taponamiento del canal (Resh, 2012).

Es por esto que el objetivo de este estudio es Evaluar la resistencia al hongo necrótrofo *Alternaria* sp en brócoli en dos sistemas de cultivo (Suelo e Hidroponía). Se realiza esta investigación con el objetivo de encontrar relaciones iniciales en cuanto a la presencia de microorganismos en el sustrato con capacidades de potenciar el crecimiento e inhibir la severidad de infección brindando así cierto nivel de resistencia. A futuro, esto podría favorecer una agricultura con un rendimiento mucho mayor y un mejor biocontrol de patógenos de una forma más ambientalista.

## 2. MÉTODOS

A lo largo de este estudio se utilizaron tres sustratos: El primero corresponde a muestras de suelo agrícola; mientras que el segundo corresponde a muestras de suelo nativo ambas provenientes de la provincia de Carchi en la localidad de Tufiño en Ecuador; mientras que el tercer sustrato utilizado es la solución nutritiva Hoagland utilizada en la hidroponía.

### 2.1 Cuantificación de grupos microbiológicos entre sistemas de cultivo

Se realizó una cuantificación de grupos microbianos de interés en ambos sistemas de cultivo (Suelo e Hidroponía). Es importante mencionar que se realizaron siembras en placa utilizando diluciones de Suelo Agrícola, Suelo Nativo e Hidroponía.

En el caso de los suelos se utilizó 1 gramo de suelo de cada tratamiento (Agrícola y Nativo) y se lo diluyó en 9 mililitros de solución salina previamente autoclavada para dar lugar a la dilución  $10^{-1}$ .

Por otro lado, en el caso de la solución nutritiva proveniente de la hidroponía se utilizaron 10 ml de solución nutritiva y se lo diluyó en 90 mililitros de solución salina previamente autoclavada para dar lugar a la dilución  $10^{-1}$ .

Posteriormente, en ambos sustratos a partir de la dilución  $10^{-1}$  se realizaron diluciones seriadas las cuales serían sembradas por duplicado mediante la técnica de extensión en placa en la que se colocan 100 microlitros de cada dilución en los medios de cultivo detallados en la Tabla 1 y Tabla 2 para la cuantificación de bacterias y hongos en el suelo (Norman y Clarck, 1965).

Finalmente, tras la obtención de los conteos de unidades formadoras de colonia de cada medio de cultivo se realizó una conversión logarítmica de los mismos complementado con ANOVA y Tukey mediante el software R-studio para determinar la presencia de diferencias significativas de biomasa entre los sustratos estudiados.

### 2.2 Establecimiento de sistemas de cultivo

Se establecieron dos sistemas de cultivo: suelo (con 2 sustratos-suelo nativo (Nat) y suelo agrícola (Ag) e hidroponía. El primer sistema de cultivo se basó en la utilización tanto del suelo agrícola como del suelo nativo en dos concentraciones 10% y 50%. Cabe mencionar que se utilizó

la perlita (sustrato inorgánico) como complemento al sustrato orgánico de cada suelo dado a que es estéril, neutro y tiene grandes capacidades de retención de agua. Lo antes mencionado dio lugar a 4 tratamientos: 2 de suelo Nativo (10% Nativo y 50% Nativo); y 2 de suelo agrícola (10% Agrícola y 50% Agrícola).

Por otro lado, el segundo sistema de cultivo fue constituido por la hidroponía para lo cual se obtuvieron plantas de brócoli las cuales posteriormente, al mostrar dos hojas verdaderas fueron retiradas de su sustrato, lavadas con agua destilada y trasplantadas al hidropónico. Estas plantas fueron nutridas mediante la recirculación de la solución Hoagland.

### **2.3 Análisis del crecimiento por peso fresco**

Tras realizar la siembra de las plantas de brocoli en el suelo y el trasplante correspondiente a los hidropónicos se dejó desarrollar a las plantas durante un mes en ambos sustratos para posteriormente comparar los resultados obtenidos en cuanto al peso fresco. En relación a esto, se tomaron las plantas tras el mes de cultivo, se retiró la raíz y se procedió a pesar únicamente la parte aérea de la planta para obtener pesaje fresco individual de cada tratamiento para así ser capaces de obtener medias de crecimiento las cuales serán comparadas mediante la prueba estadística ANOVA y Tukey en el software R-studio para determinar la significancia de las diferencias evidenciadas. Cabe mencionar que de los tratamientos provenientes del suelo se tomaron 9 muestras de cada uno; mientras que del sistema hidropónico se tomaron 22 muestras.

### **2.4 Aislamiento del hongo necrótrofo *Alternaria* sp**

Para aislar el hongo *Alternaria* sp se tomaron muestras de hojas de brócoli que presentaban la infección fúngica provenientes de la empresa Agrogana ubicada en la provincia de Cotopaxi. Una vez en el laboratorio se tomó las hojas y se realizó un proceso de desinfección el mismo que consistió en: 1) Se toman las muestras y se realiza un primer lavado con agua común. 2) Se realizan cortes mediante un bisturí para obtener cuadrados que contengan tanto lesión como hoja sana. 3) Se realiza un lavado en hipoclorito de sodio 1,5% durante 1 minuto. 4) Con una pinza estéril se pasa los retazos a un recipiente con agua destilada estéril durante 30 seg. 5) Lavado con alcohol 70% durante 45 seg. 6) Lavado en agua destilada estéril durante 30 seg. 7) Secado en papel estéril

y siembra de cuadrados de 5\*5 mm en medio PDA para su incubación y crecimiento (**Anexo 3**). Finalmente, se observó crecimiento se realizó identificación de *Alternaria* tanto macroscópicamente (en base a claves taxonómicas) como microscópicamente (en donde se observó características específicas para su identificación) (Meena, Swapnil, y Upadhyay, 2017).

## 2.5 Bioensayos

En cuanto a la estandarización de los bioensayos se realizó primeramente un ensayo para determinar el potencial de infección de los tres aislados previamente obtenidos y posteriormente un bioensayo para analizar la severidad de infección. Ambos bioensayos fueron realizados en una cámara húmeda que consistía en un contenedor plástico con papel humedecido en la base cubierto por papel film de cocina para proporcionar humedad que favorezca el crecimiento fúngico.

En relación al bioensayo del potencial de infección se tomaron los tres aislados y se realizó microscopía para determinar las condiciones de esporulamiento. Posteriormente, en los aislados con presencia de esporas se realizó un lavado con solución salina a la caja Petri donde se encontraba el hongo para obtener todas las esporas y se filtro la solución resultante. Una vez filtrada se procedió a realizar un conteo en la cámara de NeuBauer para obtener una solución con una concentración de esporas de  $1 \cdot 10^5$ - $10^6$ . Finalmente, se inoculó 10 microlitros de solución salina + esporas de cada aislado en 2 hojas de cada planta estudiada junto con un control en el que se inoculó únicamente 10 microlitros de solución salina de igual manera en dos hojas.

Cabe mencionar a partir de los resultados obtenidos siete días post inoculación se generó una escala de infección en relación a la severidad observada la cuál iba desde daño por inoculación (Severidad 1) hasta presencia de necrosis y clorosis (Severidad 4).

Para el bioensayo de severidad de infección se repitió el proceso previamente mencionado con la única diferencia que se utilizó únicamente el aislado 3.2 debido a que fue el aislado que presentó mayor virulencia en el bioensayo previo en ambos sistemas de cultivo (suelo e hidroponía). Finalmente, se analizaron los resultados al día nueve post inoculación.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Cuantificación de grupos microbiológicos entre sustratos

Para determinar diferencias entre grupos microbianos de interés se realizó la siembra en medios de cultivo para cuantificación y comparación de resultados entre sustratos. Para determinar la significancia de las diferencias observadas entre sustratos en relación a biomasa presente se utilizaron pruebas estadísticas ANOVA y Tukey con un nivel de significancia del 95% en donde un valor  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

Inicialmente se realizó un recuento de bacterias aerobias totales mediante el medio 1/10 TSA en donde se evidenció una mayor presencia de biomasa en los suelos (agrícola y nativo) frente al sistema hidropónico. El suelo nativo es el que presenta mayor biomasa en relación a los otros sustratos estudiados. Además, las diferencias en biomasa fueron significativas tanto entre suelo agrícola y nativo como con el sistema hidropónico (**Figura 1 I**).

Posteriormente, se cuantificó las bacterias gram positivas y gram negativas. En cuanto a las gram positivas se observó que estas presentan una mayor biomasa en suelos (agrícola y nativo) frente al sistema hidropónico. En relación a los sustratos estudiados las diferencias en biomasa entre suelos no presentaron significancia alguna mientras que entre suelo e hidroponía dichas diferencias si fueron significativas (**Figura 1 II**). Por otro lado, en el caso de las gram negativas se evidenciaron diferencias significativas entre todos los sustratos siendo el suelo nativo el sustrato con mayor biomasa de bacterias gram negativas (**Figura 1 III**).

Luego, se cuantifico las bacterias solubilizadores de nutrientes (de gran importancia por su conversión de sustratos no disponibles en biodisponibles para el uso de la planta), *Pseudomonas* (con importancia en crecimiento e inmunidad vegetal) y fijadoras de nitrógeno (que favorecen el crecimiento vegetal). En el caso de las bacterias solubilizadoras de potasio se observó mayor biomasa en suelo que en hidroponía; además de diferencias significativas entre todos los sustratos siendo el suelo agrícola el sustrato con mayor biomasa presente (**Figura 1 IV**). Por otro lado, las bacterias solubilizadoras de fosfato mostraron una mayor biomasa presente en suelos frente a hidroponía cuya diferencia fue significativa; mientras que no se evidenciaron diferencias

significativas entre sustratos de suelo agrícola y nativo (**Figura 1 V**). En el caso de *Pseudomonas* se observó que las diferencias entre todos los sustratos eran significativas siendo la mayor presencia de *Pseudomonas* en el suelo agrícola y la menor biomasa presente en el suelo nativo (**Figura 1 VI**). Finalmente, en relación a las bacterias fijadoras de nitrógeno se observó que las diferencias en biomasa entre todos los sustratos fueron significativas existiendo mayor biomasa en ambos suelos que en hidroponía. Cabe mencionar que el suelo en el que se evidenció mayor cantidad de biomasa fue el suelo agrícola (**Figura 1 VII**).

Como resultado de la cuantificación de hongos se evidenció una mayor presencia de hongos en suelos en relación a la hidroponía. En cuanto a los suelos se observó mayor biomasa fúngica en suelo agrícola que en suelo nativo. Cabe mencionar que las diferencias evidenciadas fueron significativas entre todos los sustratos y que dicha tendencia de biomasa presente se repitió en conteos de mohos y levaduras (**Figura 1 VIII-X**). Finalmente, en cuanto a la cuantificación de *Trichodermas* se evidenció una concentración de biomasa considerablemente superior en los sustratos provenientes de suelo frente a la hidroponía. Cabe mencionar que se encontraron diferencias significativas entre todos los sustratos siendo la mayor presencia de biomasa identificada en el suelo nativo (**Figura 1 XI**). En conclusión se evidenció una mayor riqueza microbológica en suelos con predominancia de gram positivas que en el sistema hidropónico donde predominaron las gram negativas. Además, el suelo agrícola presenta una mayor cantidad de bacterias que el suelo agrícola; mientras que el suelo agrícola presenta un mayor número de hongos que su contraparte.

### **3.2 Análisis del crecimiento por peso fresco**

En base al análisis del peso fresco se evidenció un mayor crecimiento en el sistema hidropónico frente a los sustratos que contaban con suelo. Por otro lado, en el caso del suelo se evidenció que el suelo agrícola 10% presentaba un mayor crecimiento frente a los demás tratamientos estudiados. Además, cabe recalcar que no se observaron diferencias significativas entre concentraciones del suelo nativo mientras que en el suelo agrícola se evidenció que el suelo agrícola 10% presentaba un crecimiento significativamente mayor al suelo agrícola 50%. En el caso del suelo Nativo 10%

se evidenció peso medio de 2,4 gramos; en el suelo nativo 50% se evidenció peso medio de 2,385 gramos. Por otro lado, en el caso del suelo agrícola 10% se observó un peso medio de 2,75 gramos; mientras que en el suelo agrícola 50% se evidenció un peso medio de 1,75 gramos. Finalmente, en el sistema hidropónico dió resultado un peso promedio de 3,367 gramos. Esto fue contrastado con una prueba ANOVA seguida de una prueba Tukey mediante R-studio donde se observó que la diferencia antes mencionada en cuanto al crecimiento de la planta entre el sistema hidropónico y el suelo agrícola 10% versus el suelo nativo en ambas concentraciones y el suelo agrícola 50% es significativa (**Figura 3**).

### **3.3 Aislamiento del hongo necrótrofo**

Para posteriormente realizar los bioensayos de severidad de infección se aislaron y obtuvieron 3 morfologías de *Alternaria* sp los cuales fueron confirmados mediante el análisis macroscópico y microscópico del hongo basado en guías taxonómicas (Rivas, 2014) (Woudenber, et al., 2013) (Woudenber, et al., 2015)(**Figura 4I-IV**).

### **3.4 Bioensayos**

#### **3.4.1 Bioensayo de Potencial de infección.**

Se probaron los tres aislados obtenidos previamente con la finalidad de determinar cual presentaba mayor virulencia para ser utilizado posteriormente en el bioensayo de severidad de infección. Se evidenció que el aislado 3 presentaba la mayor severidad de infección evidenciable por la presencia de necrosis y clorosis al séptimo día (**Figura 5I-II**). Finalmente, a partir de las hojas infectadas mediante el aislado de *Alternaria* sp 3 se obtuvo la escala de infección utilizada para medir la severidad en el bioensayo de severidad de infección en sustratos (**Figura 5III**).

#### **3.4.2 Bioensayo de severidad de infección en sustratos.**

Para evaluar y comparar la severidad de la infección por *Alternaria* sp entre tratamientos se realizó el bioensayo en donde se inoculó dos hojas por planta con solución que contenía esporas para analizar la severidad de infección fúngica desarrollada a lo largo de nueve días en donde se evidencio lo representado en la **Figura 6**. En base a esto, se pudo evidenciar una

mayor severidad en las plantas cuyo sustrato provenia del suelo nativo; mientras que se evidenció una mayor severidad en el suelo agrícola. Además, un resultado interesante es la menor severidad de infección presente en el sistema hidropónico en comparación con el suelo nativo. Finalmente, se evidenció que a mayor concentración de suelo nativo se evidenciaba una mayor severidad de infección; mientras que a mayor concentración de suelo agrícola la severidad de la infección disminuía.

Debido a la importancia de estos resultados se realizaron pruebas estadísticas de chi cuadrado generales y pareadas. En cuanto a la prueba chi cuadrado general se evidenció que las diferencias evidenciadas en cuanto a severidad de infección entre sustratos eran significativas (**Figura 6**). Por otro lado, al comparar de manera pareada se evidenció que ambas concentraciones de suelo nativo presentaban una mayor severidad que el sistema hidropónico siendo esta diferencia significativa. Además, al comparar el suelo agrícola con el sistema hidropónico se observó que la severidad en el suelo agrícola era menor ; sin embargo, dicha diferencia en severidad únicamente fue significativa en el suelo agrícola 50% . Por otro lado, se comparó los resultados obtenidos entre concentraciones de suelos en donde se evidenció que el suelo nativo presentaba diferencias significativas debido a que el suelo nativo 50% presenta una infección mas severa que el suelo nativo 10%; mientras que el suelo agrícola no presentaba diferencias significativas a pesar de que se evidencia una menor severidad en el suelo agrícola 50%. Finalmente, en comparaciones entre suelos nativo y agrícola con la misma concentración se evidenció que tanto las diferencias en severidad entre Nat 10% y Ag10%; como Nat 50% y Ag 50% eran significativas evidenciándose una mayor severidad de infección en ambos tratamientos de suelo nativo en comparación con los tratamiendos de suelo agrícola (**Tabla 3**).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Cuantificación de grupos microbiológicos entre sistemas de cultivo

En base a los resultados de la **Figura 1** se puede evidenciar una tendencia clara en la que los suelos tanto el nativo como el agrícola presentan una mayor cantidad de biomasa de microorganismos estudiados en comparación con el sistema hidropónico por lo que este muchas veces busca ser bioaumentado mediante la adición de microorganismos de interés (Vallance, et al., 2011). Lo antes mencionado es respaldado por los resultados de este estudio en el que se evidencian diferencias considerables principalmente en dos grupos bacterianos de gran importancia: Las gram negativas relacionadas a fijación de nitrógeno, conversión de nutrientes, crecimiento vegetal y las *Pseudomonas* involucradas en crecimiento y modulación de inmunidad (Filian, 2021).

En el caso del sistema hidropónico y su predominancia de *Pseudomonas* se piensa que esta podría deberse a su facilidad y efectividad para colonizar los sistemas radiculares de las plantas cultivadas en hidroponía. Esto fue determinado en un estudio realizado por Sheridan y colaboradores en donde utilizaron microorganismos que promueven crecimiento vegetal en un sistema hidropónico en 4 cultivos distintos; dando lugar a la observación de una efectiva colonización en la que las proteobacterias representaban alrededor del 40% del microbioma analizado en donde se evidenció una predominancia de *Pseudomonas* (Sheridan, et al., 2017).

Las principales diferencias observadas radican en la predominancia de grupos bacterianos evidenciada en el suelo y la hidroponía; en una investigación desarrollada por Kyere y colaboradores en donde comparan el microbioma de plantas cultivadas en suelo frente a plantas cultivadas en hidroponía se observó resultados que concuerdan con lo evidenciado durante nuestra investigación en donde se determinó que el sistema hidropónico presenta una predominancia de bacterias gram negativas como la son las proteobacterias evidenciando una predominancia significativa de *Pseudomonas*; mientras que el suelo muestra predominancia de bacterias gram positivas como lo son los Firmicutes donde predominó la presencia de *Bacillus* (Kyere, et al., 2020). Lo antes mencionado podría favorecer la explicación de la gran abundancia de *Pseudomonas* en el sistema hidropónico; así como, la llamativa presencia de gram positivas como

*Bacillus* tanto en el suelo nativo como en el suelo agrícola observadas en los conteos microbiológicos realizados. Cabe mencionar que en el estudio realizado por Kyere y colaboradores se determinó que la presencia tanto de *Pseudomonas* como de *Bacillus* y su predominancia en el sistema de cultivo ya especificado no significa la ausencia de su contraparte tanto en el suelo como en la hidroponía.

#### 4.2 Análisis del crecimiento por peso fresco

En cuanto a los resultados de la **Figura 3** se puede determinar que el análisis de crecimiento por peso fresco evidenció que los tratamientos compuestos por suelo nativo y agrícola presentaban un crecimiento menor en comparación con el sistema hidropónico; la única excepción se evidencia en el suelo Agrícola10% que no presenta diferencias significativas frente a la hidroponía. A sido reportado en varios estudios que la biomasa resultante de un cultivo tradicional será significativamente menor (alrededor de un 16%) a la biomasa resultante de un cultivo hidropónico por lo que la hidroponía podría considerarse una alternativa viable al cultivo tradicional como resultado de su mejor rendimiento así como de su menor generación de desperdicios de recursos naturales (García, et al., 2003).

Además, en cuanto al mayor crecimiento evidenciado en el hidropónico se podrían plantear dos hipótesis: La primera es estudiada en un estudio realizado por Marlon Rojas en el que se analiza de manera comparativa el crecimiento en hojas de lechuga en donde se comparó el crecimiento de este cultivo en hidroponía usando tres sustratos nutritivos (alfalfa, hojarasca y solución nutritiva comercial). Como resultado se evidenció que las plantas de lechuga presentaban un mayor crecimiento al ser nutridas con la solución nutritiva comercial que proveía macro y micronutrientes esenciales para el desarrollo vegetal (Rojas, 2019). Y, la segunda hipótesis la cual hace referencia a los beneficios otorgados por las bacterias del género *Pseudomonas* las cuales se ha determinado que favorecen el crecimiento vegetal gracias a su capacidad de solubilizar fósforo permitiendo así que el fósforo sea utilizado por la planta y por ende, mejorar el crecimiento vegetal; mientras que se evidenció que bacterias del género *Bacillus* presentaban una capacidad de solubilización de fosfato baja (Oteino, et al., 2015). Lo antes mencionado puede brindar directrices sobre una posible

causa del bajo crecimiento de plantas en tratamientos con suelo observado en nuestro estudio puesto que este sustrato, al tener una predominancia de Gram positivas siendo estas mayoritariamente *Bacillus*, se podría esperar un crecimiento menor debido a la ineficacia en cuanto a la solubilización de nutrientes; mientras que la hidroponía y el suelo agrícola mostraron una predominancia de *Pseudomonas* lo cual podría explicar su mayor crecimiento.

Finalmente, es posible determinar que el crecimiento será determinado tanto por los microorganismos de interés como por la disponibilidad de nutrientes del sustrato donde se desarrolla el cultivo.

### 4.3 Bioensayo de severidad de infección en sustratos

Finalmente, en relación a lo observado en la **Figura 6** en donde se analizó el grado de severidad de la infección por *Alternaria* sp evidenciado en los distintos tratamientos se determinó:

Primero, las diferencias entre sustratos estudiados en cuanto a severidad de infección fueron significativas en donde se evidenció una mayor severidad en los tratamientos con suelo de origen nativo y una menor severidad en los tratamientos con suelo de origen agrícola. Segundo, al realizar pruebas pareadas de chi cuadrado entre los distintos tratamientos evidenciadas en la **Tabla 3** se determinó: Ambos tratamientos de suelo nativo presentan una infección significativamente más severa que el sistema hidropónico; mientras que los tratamientos de suelo agrícola presentan una infección con menor severidad en ambas concentraciones en donde la única diferencia observada considerada significativa es la evidenciada en el suelo agrícola 50%. Por otro lado, en cuanto a las comparaciones entre tratamiento se observó que tanto las diferencias en severidad entre suelo Nativo 10% comparado con el suelo Agrícola 10% como de suelo Nativo 50% comparado con el suelo Agrícola 50% son significativas evidenciando una mayor severidad de infección en el suelo nativo en ambas concentraciones.

En cuanto a la menor severidad evidenciada en el suelo agrícola y la hidroponía se piensa que esta se podría deber a la predominancia de *Pseudomonas* en su microbioma esto debido a que se ha reportado evidencia de potenciales beneficios de este género bacteriano en la modulación y preactivación de la inmunidad vegetal. Además, se ha determinado que la presencia de ciertas

cepas de esta bacteria reducen la severidad de infección tanto de enfermedades de origen bacteriano como de infecciones fúngicas; y por ende, mejoran el rendimiento de los cultivos (Pieterse, et al., 2020). Por otro lado, se ha evidenciado que suelos agrícolas pueden favorecer la diversidad presente en el microbioma de la planta mejorando el fenotipo de la planta lo cual puede evidenciarse no solo en una mayor diversidad microbiológica en la rizosfera si no también en un mayor crecimiento lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (Pérez, et al., 2019).

Por otro lado, en cuanto a *Trichoderma* se evidenció mayor prevalencia en el suelo nativo lo cual podría indicar una posible relación entre su presencia como control de la severidad de infección y en mejoría del crecimiento (Harman, et al., 2004); sin embargo, contrarió a lo expuesto en la literatura el sustrato con mayor prevalencia de *Trichoderma* presentó la mayor severidad de infección y su crecimiento fue menor al sistema hidropónico. En base a lo antes mencionado se podrían plantear teorías o análisis futuros para dilucidar su relación.

En conclusión, es evidente que los microorganismos presentes en el microbioma de la planta juegan un papel de gran importancia al momento de determinar factores como el crecimiento o la resistencia a infecciones por patógenos. Esto se debe a que se ha visto que suelos ricos en bacterias solubilizadores de nutrientes presentarán un mayor crecimiento debido a la biodisponibilidad de los mismos. Así mismo, se ha evidenciado que ciertas cepas de *Pseudomonas* favorecerán no solo el crecimiento si no modularan y preactivaran el sistema inmune ante infecciones patógenas. Finalmente, es importante recalcar que debido a la ausencia de una identificación molecular específica estos resultados no son totalmente concluyentes; por ende, deberían ser complementados con resultados obtenidos de conteos de siembras basadas en la raíz; y, con una cuantificación molecular para determinar especies y concentraciones bacterianas y fúngicas específicas lo cual facilitaría la generación de hipótesis relacionadas al crecimiento y severidad de infección evidenciados.

## 5. CONCLUSIONES

En cuanto a la cuantificación de biomasa se pudo evidenciar una mayor riqueza microbiológica en ambos suelos en comparación al sistema hidropónico. En el caso del suelo nativo se observó una predominancia de bacterias en relación al suelo agrícola; mientras que el suelo agrícola presentó una predominancia de hongos en relación a su contraparte. Finalmente, se evidenció una predominancia de bacterias gram positivas en los suelos; mientras que en el sistema hidropónico predominaban las gram negativas lo cual puede atribuirse a la baja presencia de bacterias gram positivas limitando la competencia y permitiendo su proliferación. Dentro de las bacterias gram negativas *Pseudomonas* fue uno de los ejemplares mas importantes, encontrados mayoritariamente en el sistema hidropónico y en el suelo agrícola, por su papel en resistencia y crecimiento vegetal.

Por otro lado, en cuanto al crecimiento vegetal en los distintos sustratos se evidenció un mayor crecimiento en el sistema hidropónico y en el suelo agrícola 10%; mientras que el resto de sustratos estudiados presentaron un crecimiento menor el cual no fue significativamente diferente. Además, algo llamativo es la reducción de tamaño al aumentar la concentración de suelo agrícola lo cual puede deberse al aumento de concentración de ciertos grupos bacterianos o fúngicos; sin embargo, se requeriría un análisis molecular para ser capaz de generar conclusiones más específicas respecto a esta diferencia importante en crecimiento.

Finalmente, en cuanto a la severidad se evidenció una menor severidad en la hidroponía y suelo agrícola los cuales tenían una prevalencia de *Pseudomonas* las cuales se cree jugaron un papel vital en la activación de la respuesta inmune de la planta. Por otro lado, la infección presentó mayor severidad en el suelo nativo donde se observó una mayor presencia de gram positivas lo cual pudo haber facilitado la infección. Sin embargo, se requieren investigaciones complementarias para determinar de manera específica los microorganismos relacionados a la resistencia o susceptibilidad de infección presentes en cada sustrato.

A futuro, se comparará los conteos de biomasa realizados con diluciones provenientes de raíz de las plantas estudiadas y se complementará la información obtenida con cuantificaciones moleculares mediante las técnicas moleculares BacQuant y FungiQuant las cuales permitirán la generación de hipótesis y obtención de conclusiones mucho más complejas al partir de un panorama mucho más amplio.

## 6. TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo para cuantificación bacteriana

Medio de cultivo	Función	Referencias
<b>1/10 Agar Triptona de Soya (TSA)</b>	Conteo de bacterias aerobias totales.	(Balestra & Misagui, 1997)
<b>T3</b>	Conteo de Gram positivas.	(Travers, Martin, & Reichelderfer, 1987)
<b>1/10 TSA + Cristal Violeta</b>	Conteo de Gram negativas.	(Hagedorn, Bardinelli, & Zablutowicz, 1987)
<b>Aleksandrow</b>	Conteo de bacterias solubilizadoras de potasio.	(Verma, Patidar, & Vaishampayan, 2016)
<b>Medio trifosfato de calcio (TCP-NBRIP)</b>	Conteo de bacterias solubilizadoras de fosfato.	(Shekhar, 1999)
<b>Kings</b>	Conteo de <i>Pseudomonas</i> .	(Brown & Lowbury, 1965)
<b>Agar manitol + Rojo congo</b>	Conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno.	(Kneen & LaRue, 1983)

Medios de cultivo utilizados para la cuantificación de grupos microbianos de interés de origen bacteriano.

**Tabla 2.** Medios de cultivo para cuantificación fúngica

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Función</b>	<b>Referencias</b>
<b>Agar Dextrosa de Papa (PDA)</b>	Conteo de levaduras.	(Ravimannan, et al, 2014)
<b>Agar Dextrosa de Papa (PDA) + Rosa de bengala (RB)</b>	Conteo de Mohos.	(Jayaram & Nagao, 2018)
<b>TSM</b>	Conteo de <i>Trichodermas</i> .	(Elad, Chet, & Henis, 1981)

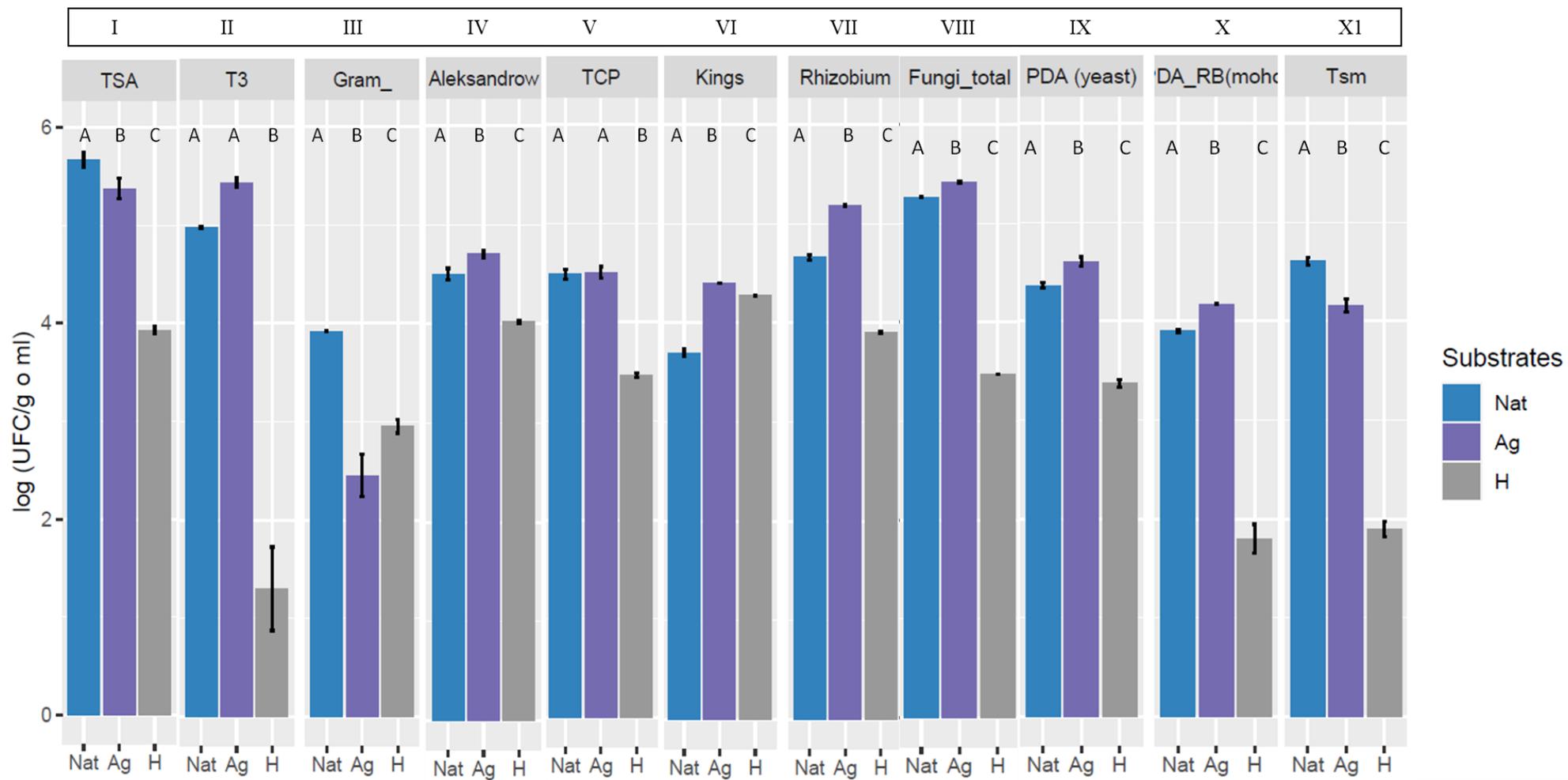
Medios de cultivo utilizados para la cuantificación de grupos microbianos de interés de origen fúngico.

**Tabla 3.** Análisis de chi cuadrado pareado en severidad de infección

Tratamiento	Severidad
Hidropónico vs Nat10%	Mayor severidad en suelo nativo 10% ( $X^2= 15,89$ ; $p<0,05$ )
Hidropónico vs Nat50%	Mayor severidad en suelo nativo 50% ( $X^2= 48,20$ ; $p<0,05$ )
Hidropónico vs Ag10%	Menor severidad en suelo nativo 10% ( $X^2= 6,482$ ; $p=0.09$ )
Hidropónico vs Ag 50%	Menor severidad en suelo nativo 10% ( $X^2= 22,428$ ; $p<0,05$ )
Nat 10% vs Nat 50%	Mayor severidad en suelo nativo50%. ( $X^2= 13,58$ ; $p<0,05$ )
Ag 10% vs Ag 50%	Menor severidad en suelo agrícola 50%. ( $X^2=5,12$ ; $p=0,16$ )
Nat 10% vs Ag 10%	Mayor severidad en suelo nativo. ( $X^2= 23,167$ ; $p<0,05$ )
Nat 50% vs Ag 50%	Mayor severidad en suelo nativo. ( $X^2= 72,398$ ; $p<0,05$ )

Comparación pareada de severidad en donde se determinó significancia de las diferencias observadas mediante la prueba estadística de chi cuadrado. (Valores resaltados son significativos)

## 7. FIGURAS



**Figura 1.** Cuantificación microbiológica de bacterias y hongos en suelo Nativo, Agrícola e hidroponía

Logaritmo de Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo o mililitro de solución de los distintos grupos bacterianos estudiados. I) Cuantificación total de bacterias obtenida mediante el medio 1/10 TSA para cuantificación de bacterias aerobias. II) Medio T3 utilizado para la cuantificación de gram + sometidas a tratamiento térmico capaces de esporular. III) Medio 1/10 TSA+ Cristal Violeta utilizado para la cuantificación de bacterias Gram -. IV) Medio Aleksandrow utilizado para cuantificación de bacterias solubilizadoras de potasio. V) Medio TCP utilizado para cuantificación de bacterias solubilizadoras de fosfato. VI) Medio Kings utilizado para cuantificación de *Pseudomonas*. VII) Medio Agar Manitol + Rojo Congo para cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno. VIII) Cuantificación total de hongos obtenida de la suma de conteos provenientes de Medio PDA + Medio PDA con RB. IX) Medio PDA utilizado para la cuantificación de levaduras. X) Medio PDA + Rosa de Bengala utilizado para la cuantificación de Mohos. XI) Medio TSM utilizado para cuantificación de *Trichodermas*. Posteriormente, se realizó una prueba ANOVA complementado con una prueba de TUKEY con el objetivo de determinar las diferencias significativas en relación al crecimiento ( $p < 0.05$ ). Dichas diferencias son denotadas por la presencia o ausencia de letras compartidas en un tratamiento en donde una letra diferente hace referencia a diferencias significativas.

D)

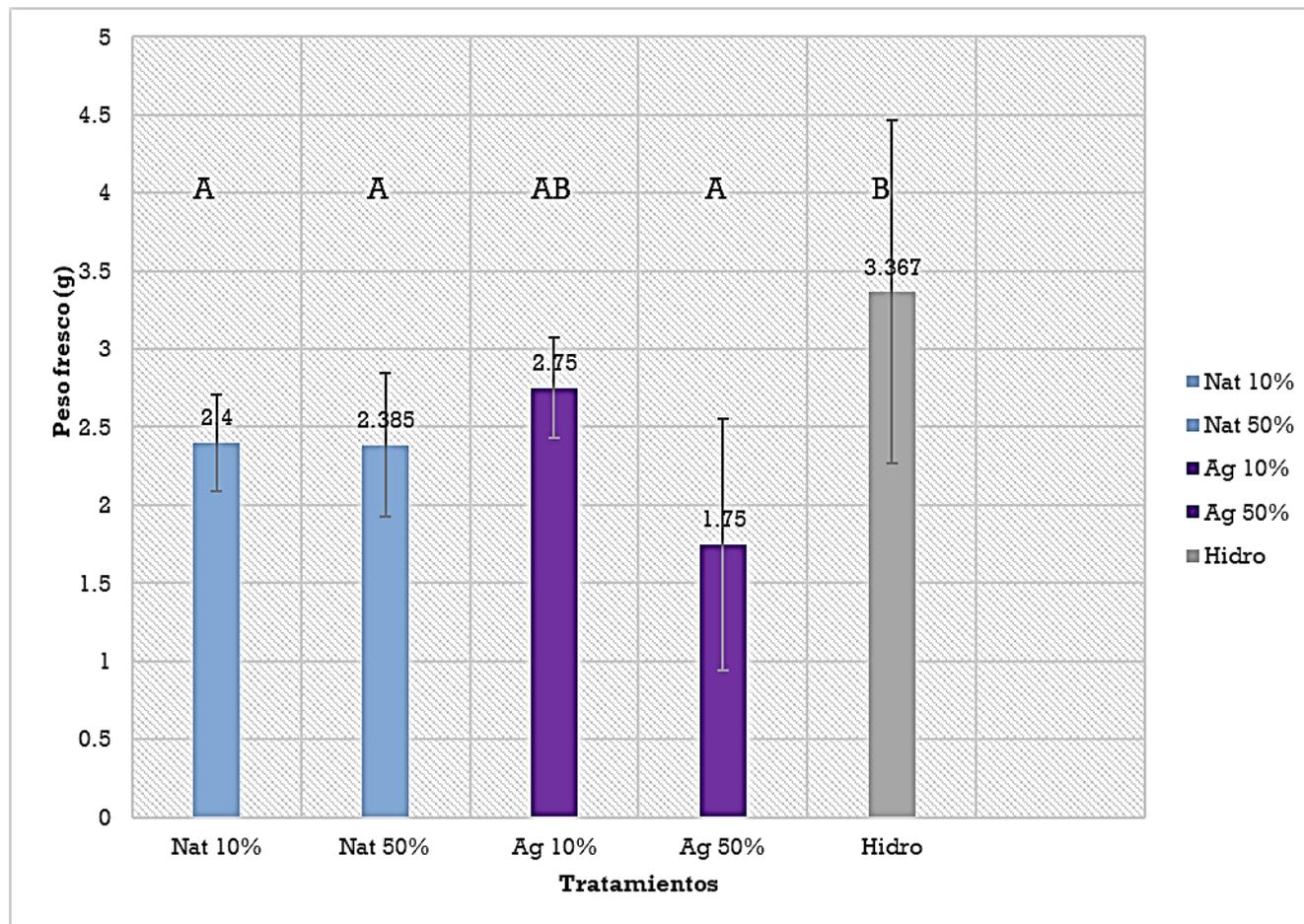


II)



**Figura 2.** Establecimiento de cultivos en suelo Nativo, Agrícola e hidroponía

Se puede evidenciar los cultivos establecidos en los tres sustratos. En el caso del suelo tanto el suelo agrícola (Ag), como Nativo (Nat) presentaron dos concentraciones las cuales fueron 10% y 50%. Esto dio lugar a cinco tratamientos Nat10%, Nat50%, Ag 10%, Ag50% e hidroponía. I) Cultivos en los sustratos provenientes de suelo agrícola y nativo. II) Cultivos en hidroponía.



**Figura 3.** Crecimiento cuantificado en función del peso fresco de la parte aérea de las plantas cultivadas en los distintos tratamientos

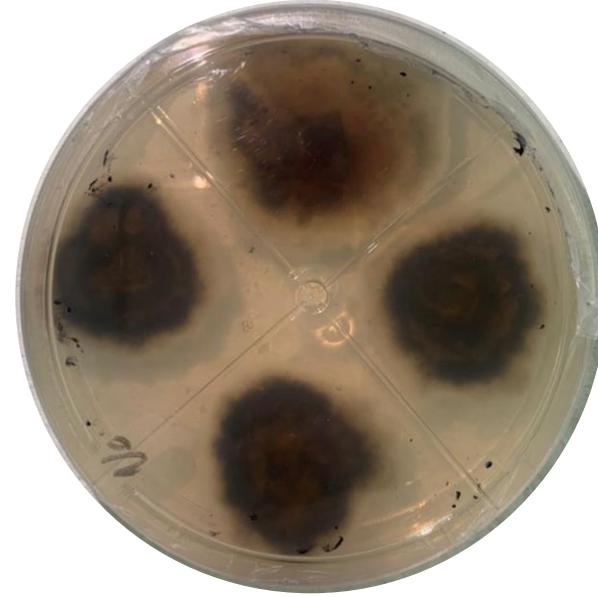
Se compara el crecimiento promedio y las barras de error correspondientes a la desviación estándar evidenciado en las plantas al someterse a tratamientos de suelo Nativo (Nat), Agrícola (Ag) e Hidroponía (Hidro). Posteriormente, se realizó una prueba ANOVA complementado con una prueba de TUKEY con el

objetivo de determinar las diferencias significativas en relación al crecimiento ( $p < 0.05$ ). Dichas diferencias son denotadas por la presencia o ausencia de letras compartidas en un tratamiento en donde una letra diferente hace referencia a diferencias significativas.

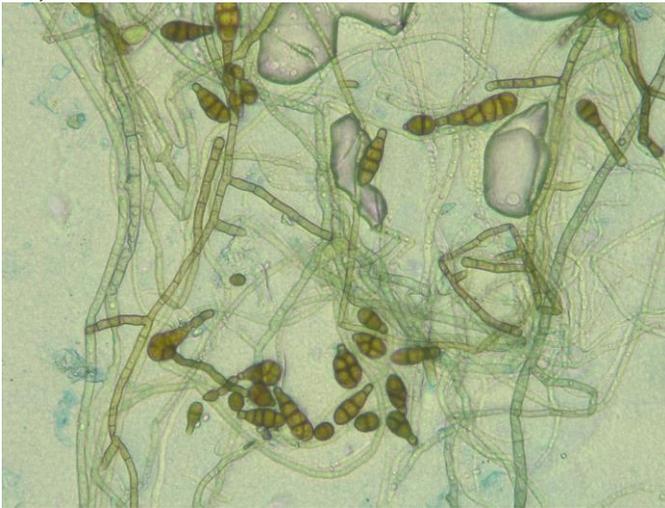
D)



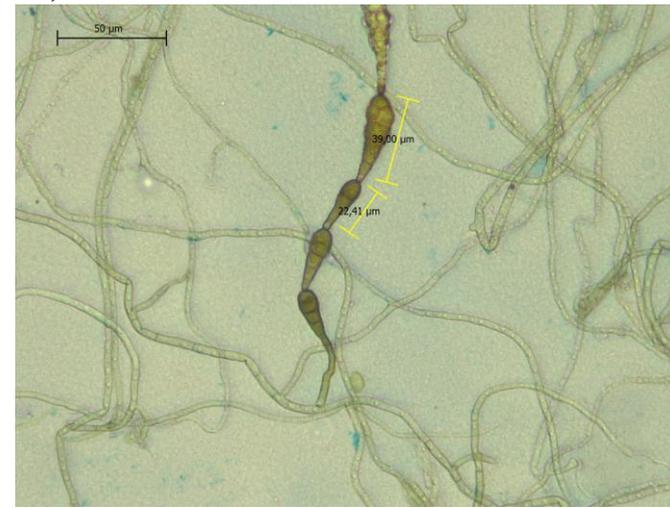
II)



III)



IV)



**Figura 4.** Aislado y microscopia de *Alternaria* sp

Aislado y microscopia del hongo necrótrofo *Alternaria* sp. I) Vista superior en medio de cultivo PDA del hongo *Alternaria* sp. II) Vista posterior en medio de cultivo PDA del hongo *Alternaria* sp. III) Microscopia del hongo *Alternaria* sp con aumento 40x. IV) Microscopía y medición de conidias del hongo *Alternaria* sp.

D)



II))

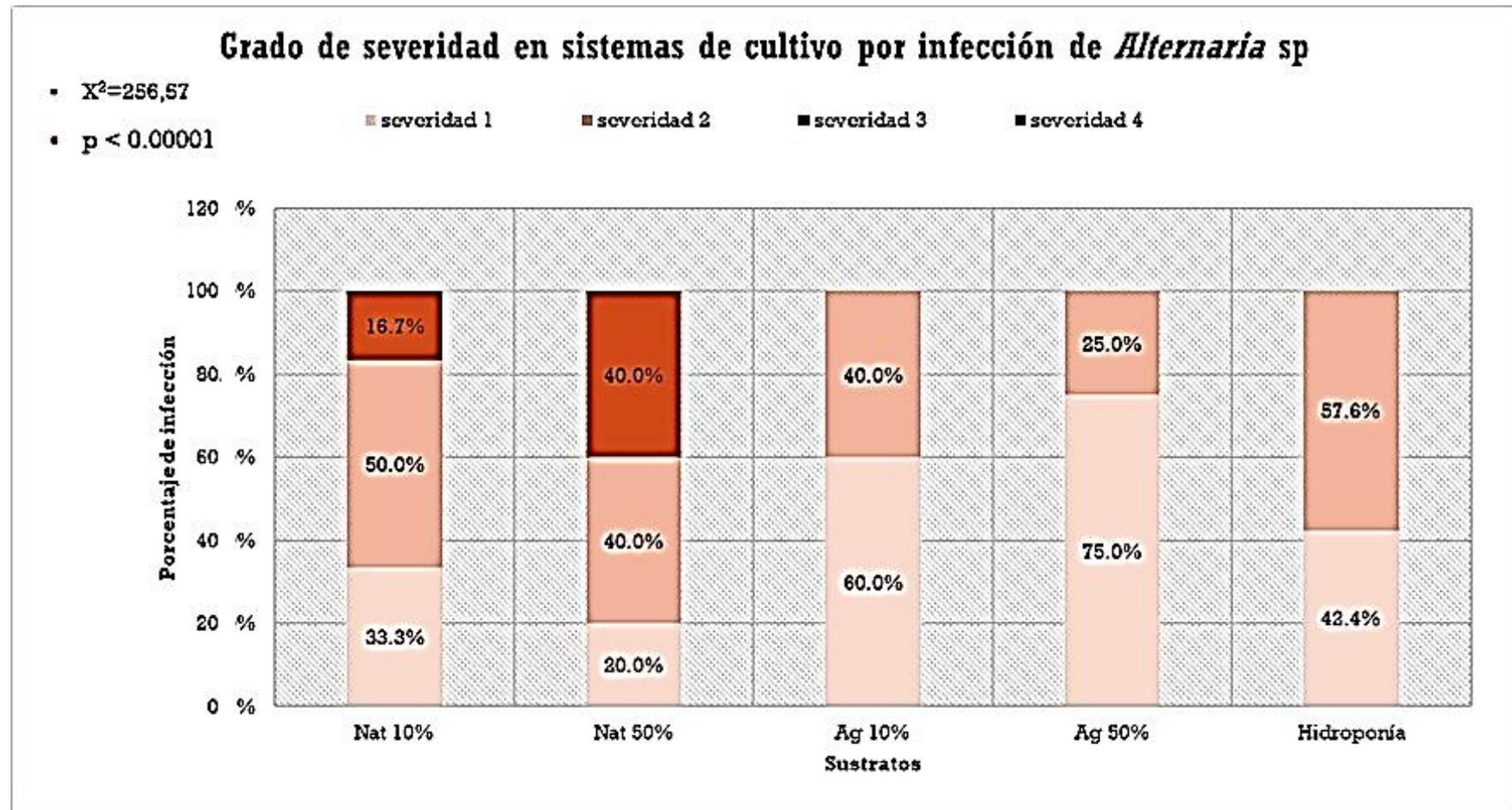


III)



**Figura 5.** Bioensayo de Potencial de infección

I) Cámara húmeda en la que se evidencia el aislado 3 comparado con el control. II) Hoja infectada en donde se evidencia la presencia de necrosis y clorosis características de la infección. III) Escala de severidad obtenida a partir del bioensayo realizado.



**Figura 6.** Severidad evidenciada en los distintos tratamientos

Se puede apreciar los resultados representados porcentualmente en cuanto a la severidad obtenida tras la realización del bioensayo en los cinco sustratos estudiados. Se evidencia que a mayor severidad de infección se presenta una coloración mas rojiza; mientras que a menor severidad la tonalidad es mucho más clara. Finalmente, se analizaron dos concentraciones de suelo nativo (10%, 50%), dos de suelo agrícola (10%, 50%) y una de hidroponía.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balestra, G., & Misagui, I. (1997). Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of microbiological methods*.
- Brown, V., & Lowbury, E. (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical Pathology*.
- Cevallos, M. (2010). PROYECTO DE PRE-FACTIBILIDAD PARA LA EXPORTACIÓN DE BRÓCOLI AL MERCADO NORUEGO PERÍODO 2010-2019. *UTE*.
- Chairin, T., Pornsuriya, C., Thaochan, N., & Sunpapao, A. (2017). *Corynespora cassiicola* causes leaf spot disease on lettuce (*Lactuca*). *Australasian Plant Dis. Notes*.
- Crisnapati, P., Wardana, N., Ady, K., & Hermawan, A. (2017). Hommons: Hydroponic management and monitoring system for an IOT based NFT farm using web technology. *Conference on Cyber and IT Service Management (CITSM)*.
- Cubas, P. (2007). Hongos. *Botánica*.
- Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *phytoparasitica*.
- FAO. (2020). *World Broccoli Production*. Obtenido de FAOSTAT: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>
- Filian, C. (2021). Importancia de las bacterias Gram negativas benéficas en la agricultura. *Universidad Técnica de Babahoyo*.
- García, M., et al (2003). RENDIMIENTO Y ASIGNACIÓN DE MATERIA SECA DE UNA VARIEDAD DE FRIJOL EN UN SISTEMA HIDROPÓNICO Y SUELO. *TERRA*.
- García, G., Domínguez, F., Mendiola, J., & Heil, M. (2017). Light environment affects the levels of resistance hormones in *Syngonium podophyllum* leaves and its attack by herbivores and fungi. *Botanical Sciences*.

- Hagedorn, W. G., Bardinelli, T., & Zablotowicz, R. (1987). New Selective Media for Enumeration and Recovery of Fluorescent Pseudomonads from Various Habitats. *Applied and Environmental microbiology*.
- Harman, G., & al, e. (2004). Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature*.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens. *Journal of Biological Sciences*.
- INEC. (2021). *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. Obtenido de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- J.Woudenberg, J.Groenewald, M.Binder, & Crous, P. (2013). Alternaria Redefined. *Studies in micology*.
- Jayaram, M., & Nagao, H. (2018). Potato Dextrose Agar With Rose-Bengal and Chloramphenicol. *School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Minden, Pulau Pinang, Malaysia. Klimik Derg.*
- Kabakeris, T. (2018). Storability of broccoli – investigations of optical monitoring, chlorophyll degradation and predetermination in the field. *ATB*.
- Kneen, B., & LaRue, t. (1983). Congo Red absorption by Rhizobium leguminosarum. *Applied and environmental microbiology*.
- Kyere, E., Palmer, J., Wargent, J., Fletcher, G., & Flint, S. (2020). Differences in nutrients concentration and microbiome community composition between hydroponically and soil grown lettuce leaves. *Massey University*.
- Liu, Y., Xu, Z., Zhu, P., Liu, Y., Zhang, Z., Xu, L., & Toyoda, H. (2009). Postharvest Black Spot Disease in Broccoli Caused by. *Ann. Rept. Kansai Pl. Prot.*
- Oteino, N., & al, e. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. *Microbiol.*
- Pérez, J., & al, e. (2019). Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (*Phaseolus vulgaris*) in native and agricultural soils from Colombia. *Microbiome*.

- Pieterse, C., & al, e. (2020). *Pseudomonas simiae* WCS417: star track of a model beneficial rhizobacterium. *Marschner Review*.
- Rashad, Y., & Moussa, T. (2019). Biocontrol Agents for Fungal Plant Diseases Management. *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications*.
- Ravimannan, N., & al, e. (2014). Alternative culture media for fungal growth using different formulation of protein sources. *Scholars Research Library*.
- Resh, H. (2012). Hydroponic Food Production. En H. Resh, *Hydroponic Food Production*. USA: CRC Press.
- Rivas, L. (2014). *Alternaria* sp. *Retrato microbiológico*.
- Rivera, M., & Wright, E. (2020). Apuntes de patología Vegetal. *Cátedra de fitopatología- Universidad Autónoma de Buenos Aires*.
- Rojas, M. (2019). Evaluación del desarrollo de la lechuga en un sistema hidropónico recirculante. *Universidad Salesiana*.
- Sánchez, A., Vargas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2020). Producción de Brócoli en Ecuador. *Observatorio económico y social de Tungurahua*.
- Shekhar, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*.
- Sheridan, C., & al, e. (2017). Microbial Community Dynamics and Response to Plant Growth-Promoting Microorganisms in the Rhizosphere of Four Common Food Crops Cultivated in Hydroponics. *Plant Microbe Interactions*.
- Tarabily, K., & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*.
- Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*.
- Toledo, J. (2003). Cultivo del brócoli. *Instituto Nacional de Investigación Agraria*.

- Travers, R., Martin, P., & Reichelderfer, C. (1987). Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Applied and environmental microbiology*.
- Vallance, J., & al, e. (2011). Pathogenic and beneficial microorganisms in soilless cultures. *Agronomy for Sustainable Development*.
- Verma, A., Patidar, Y., & Vaishampayan, A. (2016). Isolation and purification of potassium solubilizing bacteria from different regions. *Indian J microbiology*.
- Villa, A., & al, e. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Scielo*.
- Woudenber, J., Groenewald, J., Binder, M., & Crous, P. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*.
- Woudenber, J., Groenewald, J., Binder, M., & Crous, P. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in mycology*.
- Woudenberg, J., & al, e. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in micology*.

**ANEXO 1: ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO****Bacterias (1L de medio)**

- 1/10 TSA (Tryptic Soy Agar) pH7
  - 4 g mezcla de Tryptic Soy Agar
  - 13.5 g de Bacto Agar
  - 100 mg/l de Delvolid
- T3
  - 3 g de Triptona
  - 2 g de Triptosa
  - 1,5 g de extracto de levadura
  - 6,9 g de fosfato de sodio
  - 0,005 g de de Cloruro de Magnesio
  - 15 g de Agar
  - 100 mg/l de Delvolid
- 1/10 TSA (Tryptic Soy Agar) + Cristal Violeta
  - 4 g de mezcla de Tryptic Soy Agar
  - 13.5 g de Bacto Agar
  - 100 mg/l de Delvolid
  - 5 mg/l de Cristal Violeta
- Medio Aleksandrow
  - 28 g de mezcla Aleksandrow
  - 100 mg/l de Delvolid
- Medio trifosfato de calcio (TCP-NBRIP)
  - 10 g de glucosa
  - 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,2 g de KCl

0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

100 mg/l de Delvolid

- Agar King's B

38 g de Difco *Pseudomonas* Agar F

10 g de glicerol

100 mg/l de Delvolid

- Agar manitol + Rojo Congo (6.8 +- 0,2)

1 g de Extracto Levadura

10 g de Manitol

0,5 g de Difosfato de Potasio

0,2 g de Sulfato de Magnesio

0,1 g de Cloruro de Sodio

0,025 g de Rojo Congo

20 g de Agar

**Hongos (1L de medio)**

- PDA (Potato Dextrose Agar)

39 g mezcla de Potato Dextrose Agar

1 ampolla de Gentamicina

- PDA + Rosa de Bengala

39 g de mezcla de Potato Dextrose Agar

0.15 g/l de Rosa de Bengala

1 ampolla de Gentamicina

- Trichoderma Selective media (TSM)

1,4 g de Nitrato de Calcio tetrahidratado

0,26 g de Nitrato de Potasio

0,26 g de Sulfato de Magnesio heptahidratado

0,12 g de Fosfato de Potasio

1 g de Cloruro de Calcio dihidratado

0,05 g de Ácido Cítrico

2 g de Sacarosa

20 g de Agar

1 ml de Tween

1 ampolla de Gentamicina

0,05 g/l Captan 80

0,05 g/l Rovral 50

0,15 g/l de Rosa de Bengala

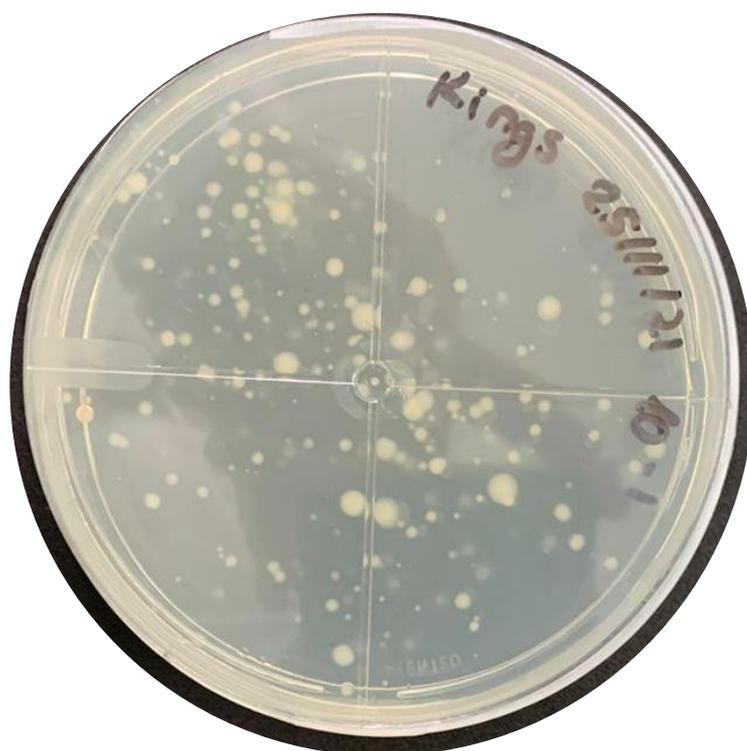
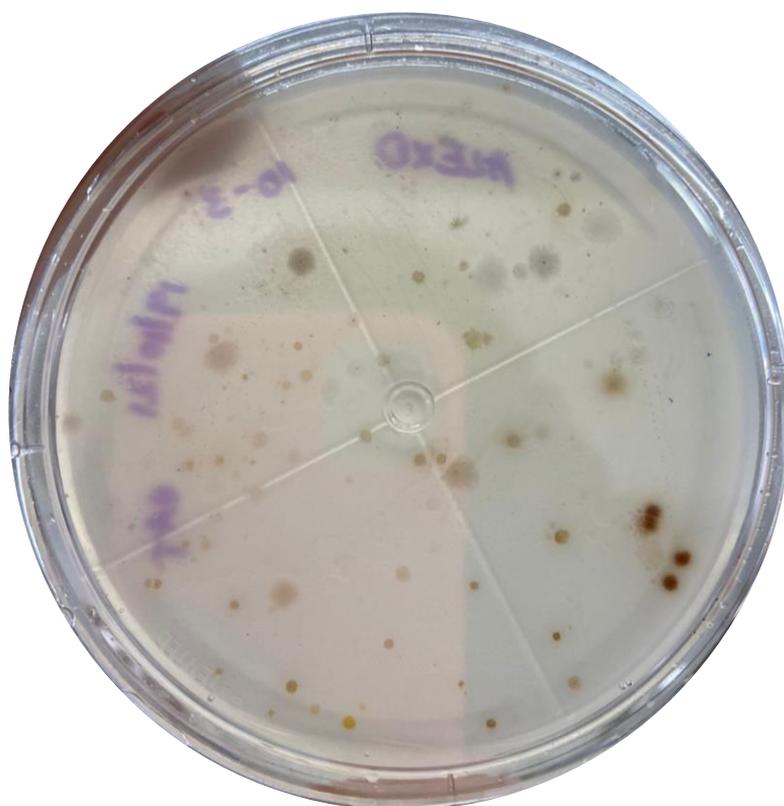
## ANEXO 2: EJEMPLOS DE CULTIVOS

## Rizobios



## PDA



**Kings****Aleksandrow**

ANEXO 3: AISLAMIENTO DE *ALTERNARIA SP*

**Figura 7.** Proceso de aislamiento de *Alternaria sp.*

Proceso realizado para el aislamiento y posterior confirmación de *Alternaria sp.*