

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Efecto de consorcios microbianos y calcio en el crecimiento e inducción de resistencia al patógeno *Alternaria alternata* en Brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*)

Sebastián Nicolás Díaz Ribadeneira

Ingeniería en Agronomía

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

Quito, 18 de mayo de 2022

Universidad San Francisco de Quito USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Efecto de consorcios microbianos y calcio en el crecimiento e inducción de resistencia al patógeno *Alternaria alternata* en Brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica)

Sebastián Nicolás Díaz Ribadeneira

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, PhD

Quito, 18 de mayo de 2022

© 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: Sebastián Nicolás Díaz Ribadeneira

Código: 00201479

Cédula de identidad: 1725028318

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2022

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 que ha ganado alto interés mundial por su valor nutricional, así como por la importancia socioeconómica para el Ecuador. Esta brassicacea, se ve afectada por el patógeno necrótrofo *Alternaria* spp. cuya sintomatología se presenta en forma de manchas foliares negra-cafecinas en forma de anillos concéntricos, que inicialmente infecta las hojas bajas y, posteriormente, tiene la capacidad de afectar la inflorescencia generando una pérdida total del valor comercial y nutricional del cultivo. Es por esto, que se busca evaluar la resistencia del hongo *Alternaria* spp. bajo el sistema hidropónico Nutriente Film Technique, compuesto de dos dietas nutricionales en base de calcio y consorcios microbianos. Para esto, se realizaron dos bioensayos; en el primero, se evaluó el crecimiento y la severidad de la enfermedad causada por *Alternaria* en plantas sometidas a diferentes dietas en base a calcio y exceso de nutrientes en plantas del híbrido Domador. En el segundo, se conformó 11 consorcios microbianos fermentados en serie de subcultivos en un medio que contiene ácido húmico y fúlvico, suero de leche y melaza, siendo el inóculo inicial un suelo nativo de Tufiño (Carchi, Ecuador). Las plantas de brócoli de 3 semanas de edad, fueron previamente inoculadas con los consorcios microbianos para posterior infección con *Alternaria* spp. y así determinar el grado de susceptibilidad o resistencia en cada tratamiento. En conclusión, se observó que dietas con calcio y exceso de sales reducen la incidencia y severidad de infección. Por el otro lado, existen ciertos consorcios microbianos que obtuvieron un 0.0 % de infección de *Alternaria* y otros que alcanzaron un 63,6 % respectivamente comparados con su testigo sin tratamiento.

Palabras clave: *Brassica oleracea* var. *Italica*, *Alternaria* spp, Hidroponía, Calcio, Microbioma, Defensa en plantas

ABSTRACT

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) is a vegetable that has gained high global interest for its nutritional value, as well as for its socioeconomic importance for Ecuador. This brassicacea is affected by the necrotrophic pathogen *Alternaria* spp. whose symptomatology is presented in the form of black-caffeine leaf spots in the form of concentric rings, which initially infects the lower leaves and, later, has the capacity to affect the inflorescence, generating a total loss of the commercial and nutritional value of the crop. For this reason, the aim is to evaluate the resistance of the fungus *Alternaria* spp. under the Nutriente Film Technique hydroponic system, composed of two nutritional diets based on calcium and microbial consortia. For this, two bioassays were carried out; In the first, the growth and severity of the disease caused by *Alternaria* in plants subjected to different diets based on calcium and excess nutrients in plants of the Domador hybrid were evaluated. In the second, 11 fermented microbial consortia were formed in a series of subcultures in a medium containing humic and fulvic acid, whey and molasses, the initial inoculum being a native soil from Tufiño (Carchi, Ecuador). The 3-week-old broccoli plants were previously inoculated with the microbial consortia for subsequent infection with *Alternaria* spp. and thus determine the degree of susceptibility or resistance in each treatment. In conclusion, it was observed that diets with calcium and excess salts reduce the incidence and severity of infection. On the other hand, there are certain microbial consortia that obtained 0.0% *Alternaria* infection and others that reached 63.6%, respectively, compared to their control without treatment.

Key words: *Brassica oleracea* var. *Italica*, *Alternaria* spp, Hydroponics, Calcium, Microbiome, Plant Defense

TABLA DE CONTENIDO

I. Introducción.....	11
1.1 Planteamiento del Problema	11
1.2 Justificación.....	13
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1 Cultivo de Brócoli	15
2.1.1 Taxonomía y Fisiología	15
2.1.2 Manejo Agronómico	15
2.2 Alternaria.....	17
2.3 Calcio.....	18
2.3.1 Inducción de resistencia a patógenos.....	19
2.4 Sistema Hidropónico: Nutrient Film Technique (NFT)	20
2.5 Medio Nutritivo Hoagland	22
2.6 Microbioma	22
III. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo General.....	23
3.2 Objetivos Específicos	23
3.3 Hipótesis.....	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Aislamiento de Alternaria	24
4.1.1 Materiales para el aislamiento de Alternaria	24
4.1.2 Recolección de Alternaria.....	25
4.1.3 Desinfección de las muestras	25
4.1.4 Preparación de medios de cultivo	25
4.1.5 Inoculación de Alternaria en medio PDA.....	26
4.1.6 Inoculación de Alternaria en hojas de brócoli	26
4.2 Bioensayo inducción resistencia calcio.....	26
4.2.1 Materiales para la siembra y cultivo de Brassica oleracea var. italica híbrido Domador	26
4.2.2 Siembra, cultivo y condiciones del bioensayo	27
4.2.3 Diseño experimental y soluciones bioensayo calcio.....	28
4.3 Bioensayo inducción de resistencia microbiomas	29
4.3.1 Materiales para la siembra y cultivo de Brassica oleracea var. italica híbrido Coronado.....	29
4.3.2 Siembra, cultivo y condiciones del bioensayo	30
4.3.3 Formación de microbiomas.....	30
4.3.4 Diseño experimental bioensayo microbioma.....	31
V. RESULTADOS.....	33
5.1 Aislamiento de Alternaria alternata.....	33
5.1.1 Identificación microscópica y macroscópica	33
5.2 Bioensayo inducción de resistencia calcio.....	34

5.2.1 Crecimiento raíz.....	34
5.2.2 Longitud hojas	35
5.2.3 Peso fresco	36
5.2.4 Peso seco.....	37
5.2.5 Incidencia Alternaria alternata.....	38
5.2.6 Severidad de Alternaria alternata.....	39
5.3 Bioensayo inducción de resistencia microbiomas	41
5.3.1 Incidencia Alternaria alternata.....	41
5.3.2 Severidad de Alternaria alternata.....	42
VI. DISCUSIÓN.....	43
6.1 Bioensayo inducción de resistencia calcio.....	43
6.1.1 Crecimiento plantas de brócoli híbrido Coronado	43
6.1.2 Incidencia y Severidad de A. alternata	44
6.2 Bioensayo inducción de resistencia microbiomas	45
6.2.1 Incidencia y Severidad de A. alternata	45
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
7.1 Conclusiones	47
7.2 Recomendaciones	47
Referencias bibliográficas	49
X. ANEXOS.....	54
ANEXO A: Medio Nutritivo Hoagland.....	54
ANEXO B: Dieta óptima Hoagland	55
ANEXO C: Dieta con exceso de calcio 5x Hoagland	56
ANEXO D: Dieta con exceso de sales Hoagland 5X	57
ANEXO E: Escala de Severidad Alternaria alternata	58
ANEXO F: Brumik	59
ANEXO G: Análisis estadístico de peso fresco híbrido Domador	60
ANEXO H: Análisis estadístico chi-cuadrado por asociación severidad híbrido Domador	61
ANEXO I: Análisis estadístico chi-cuadrado por asociación severidad híbrido Coronado	62
ANEXO J: Metodología Bioensayo Calcio	64
ANEXO K: Metodología Bioensayo Microbiomas	65
ANEXO L: Consorcios microbianos	66
ANEXO M: Sistema Hidropónico tipo NFT	67
ANEXO N: Newponia A & newponia B Crecimiento	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Morfología macroscópica de *Alternaria alternata* en medio PDA.33

Tabla 2. Morfología microscópica de *Alternaria alternata* en medio PDA.34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de un sistema hidropónico Nutrient Film Technique (NFT).	21
Figura 2. Escala de cinco grados de severidad obtenida a partir del bioensayo microbioma realizado.	32
Figura 3. Crecimiento raíz híbrido Domador (cm). *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).	35
Figura 4. Crecimiento hojas híbrido Domador (cm) vs Tiempo. *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).	36
Figura 5. Peso fresco híbrido Domador (gr). *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).	37
Figura 6. Peso seco híbrido Domador (gr). *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).	38
Figura 7. Incidencia de infección de hojas de brócoli híbrido Domador debido a inoculación con <i>A. alternata</i>	39
Figura 8. Severidad de infección de hojas de brócoli debido a inoculación con <i>A. alternata</i> . * El análisis estadístico se basó en un Chi-cuadrado por asociación (p variable).	40
Figura 9. Incidencia de infección de hojas de brócoli híbrido Coronado como respuesta a la inoculación con <i>A. alternata</i>	41
Figura 10. Severidad de infección de hojas de brócoli debido a inoculación con <i>A. alternata</i> . *El análisis estadístico se basó en un Chi-cuadrado por asociación (p variable).	42

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.) es una hortaliza que pertenece a la familia Brassicaceae. El nombre brócoli se deriva del italiano “broccolo,” siendo la planta nativa de la región del Mediterráneo. El peso fresco de una planta madura promedio de brócoli es de aproximadamente 776 g, siendo las hojas la principal porción de la planta madura al representar el 47 % y la pella el 15 %. El brócoli ha ganado interés mundial por su valor nutricional, especialmente por sus compuestos bioactivos, como el glucosilolato 24.9 $\mu\text{mol/g}$ P.F, que pueden tener efectos benéficos por su capacidad anti-oxidante y anti-inflamatoria. Adicionalmente, contienen 36 mg/100 g P.F de fibra, 56.89 g/100 g P.F de carbohidratos, 31.28 g/100 g P.F proteínas y es rico en flavonoides 103.9 $\mu\text{g RE/g}$ P.F (Hang et al., 2022).

En el año 2020 se estimó que la producción mundial de brócoli fue de aproximadamente 25.5 millones de toneladas que se distribuyen principalmente entre 78,6 % Asia, 9,5 % Europa, 9,4 % América y el resto 2,5 %. El principal productor de brócoli a nivel mundial es China con 9,5 millones de toneladas Mt (37,4 % de la producción mundial). India es el segundo país con 8,8, representando el 34,6 % de la producción mundial respectivamente, seguido por Estados Unidos con 1,2. España, México, Italia y Bangladesh son importantes productores de brócoli, pero en menor volumen (FAO, 2021). Los principales exportadores de brócoli a nivel mundial son la Unión Europea (UE) con 52 %, China 17 %, México 12 %, Estados Unidos 4 %, Ecuador con el 2 % y el resto 13 % respectivamente (Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones, 2018).

El cultivo de brócoli se concentra principalmente en la sierra andina central del Ecuador; las principales provincias productoras para el año 2018 fueron: Cotopaxi con el 91 % de la producción nacional, Chimborazo con el 5 % y el resto 4 % respectivamente. En total se

sembraron 11,431 ha para el año 2018, lo cual refleja un incremento de cuatro mil hectáreas con respecto al año 2017, mostrando una clara tendencia de crecimiento. Gracias a esto, se alcanzó una producción de 188,095 t, con un rendimiento promedio de 16.45 t/ha⁻¹ (MAG, 2018). La producción nacional se encuentra limitada ya que, en el país, solo existen cuatro plantas procesadoras con la capacidad industrial para producir 70 mil toneladas métricas t/m³ de brócoli congelado IQF; que previamente, serán exportadas por un valor de 119 millones de dólares (Líderes, 2017).

Analizando la importancia económica que el brócoli ha tenido para el Ecuador en los últimos 12 años pasando de 60 mil (toneladas) para el año 2008 a 188 mil (toneladas) para el año 2018 (Vélez y Álava, 2021). Existe la necesidad de precautelar y plantear soluciones para una nueva enfermedad emergente conocido como pudrición del florete del brócoli causada por el hongo *Alternaria* spp. que genera manchas que inician generalmente en el tejido viejo y que comienza como pequeñas lesiones circulares, que posteriormente, se expanden en anillos concéntricos de color amarillo que causan necrosidad del tejido y que tienen la capacidad de expandirse por toda la planta (Conn y Rosenberger, 2013). Este hongo tiene el potencial de causar pérdidas de entre el 30 y 50 % en la cabeza por pudriciones antes de la cosecha y en el transporte, adicionalmente, este hongo puede sobrevivir en las semillas por varios meses a pesar de variaciones significativas en la temperatura y humedad relativa (Fraire et al., 2010).

1.2 Justificación

El sector agroindustrial y agropecuario del Ecuador es de suma importancia para el crecimiento y desarrollo de la nación ya que representa el 4.61 % y 8.25 % del PIB respectivamente (MAG, 2020). Tomando en cuenta que una tonelada de brócoli ecuatoriano se comercializa en 1470 \$, lo que equivale a 1,47 \$/kg, surge la problemática en el agricultor de reducir las pérdidas causadas por fitopatógenos, para reducir las pérdidas de producción y aumentar el margen de ganancias para garantizar la rentabilidad y capacidad de exportación del cultivo (Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones, 2018).

Por el otro lado, existen muy pocos cultivares de brócoli resistentes a *Alternaria* spp. disponibles en el mercado y por tanto se recurre al control químico clásico. Actualmente, los grupos químicos e ingredientes activos más utilizados para controlar la enfermedad son: ditiocarbamatos (iprodione y procimidona), inhibidores acetilcolinesterasa, inhibidores de la succinato deshidrogenasa e inhibidores del ergosterol usados de forma intensiva y extensiva. Gracias a esto, se ha reportado que varios hongos fitopatógenos, entre ellos *Alternaria* spp., han generado resistencia a los grupos químicos antes mencionados; generando, así una dificultad para el manejo y control de dicha enfermedad (Wang et al., 2021).

Los daños ocasionados normalmente afectan a la productividad pero en caso de presentar un ataque a la pella se ve afectada seriamente la calidad comercial del brócoli. Es importante monitorear el desarrollo de las hojas, formación de brotes laterales y en la aparición del órgano floral ya que la planta es más susceptible (Agrointegra, 2017). Como medida de prevención, normalmente el agricultor aplica fungicidas que son usados durante la etapa de crecimiento del cultivo y son utilizados en dosis y en épocas inadecuadas, y por tanto, los residuos de los fungicidas son una seria amenaza a la salud del consumidor. Adicionalmente, pueden tener efectos adversos al ambiente, incluyendo al suelo, agua y aire, así como al

agricultor. Para proteger al consumidor muchos países han implementado normativas para monitorear y regular los niveles de residuos de fungicidas en los alimentos locales e importados; que no necesariamente son el mejor mecanismo de control (Goufo et al., 2021; Yuan et al., 2021).

Es por ello que es necesario implementar medidas para minimizar la aplicación de fungicidas presentes en la producción de brócoli en el Ecuador. Por tanto, este estudio busca utilizar una metodología en base a aplicaciones de consorcios microbianos y dietas de calcio para activar mecanismo de defensa presentes en las plantas. Reduciendo así los síntomas causados por enfermedades y evitando el uso de fungicidas en el campo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cultivo de Brócoli

2.1.1 Taxonomía y Fisiología

El cultivo proviene de la familia Brassicaceae, el cual se encuentra dentro de la clase Equisetopsida y a su vez en el orden Brassicales (Tropicos, 2022). El brócoli se deriva de la forma ancestral de la planta nativa del este europeo *Brassica oleracea*. Se compone de una raíz pivotante; tallos, que alcanzan una longitud de 20 a 50 cm; hojas, de color verde oscuro, raizadas y con un limbo foliar hendido; flores, pequeñas en forma de cruz de tonalidad amarilla; inflorescencias, compuestas de primordios foliares dispuestas en un corimbo primario en el extremo superior del tallo; fruto, categorizado como una silicua de valvas ligeramente convexada en un solo nervio (Oswaldo, 2011).

Las condiciones edafoclimáticas para el desarrollo del brócoli son: altura de 2,600 a 3,300 m.s.n.m; temperatura óptima de crecimiento ente los 15 a 18 °C soportando temperaturas de hasta 5 °C; humedad relativa del 70 al 80 %; suelos francos, profundos, con buena capacidad de drenaje; pH, óptimo que va entre 6.0 y 6.8 (Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones, 2018) (Corrales, 2017).

En el Ecuador entre los cultivares que predominan están el Avenger, Legacy, Marathon y Domador. Este último, es un híbrido adaptado especialmente para la temporada de transición y fría. Se caracteriza por tener una maduración intermedia, tallos limpios, porte abierto, semi domo y floretes compactos. Adicionalmente, presenta un ciclo vegetativo de 90 días, color de cabeza azul verdoso y se utiliza principalmente en la industria (Corrales, 2017).

2.1.2 Manejo Agronómico

El cultivo de brócoli en el Ecuador a diferencia de países como México o Guatemala, presenta la posibilidad de producir durante todo el año. Se prefieren suelos bien drenados, con

una acumulación moderada de sales, siendo 2.8 dS/m de conductividad eléctrica C.E, lo óptimo. Adicionalmente, se prefiere un pH entre 6 a 7.5. El riego se debe priorizar durante la etapa de crecimiento y formación de la pella, tratando de evitar suelos saturados ya que pueden inducir a una pudrición del sistema radicular. Normalmente, los productores prefieren utilizar sistemas de riego por aspersión o microaspersión, realizando un riego de forma semanal. Esto si es importante, ya que durante el último mes de cultivo se aumenta la cantidad de riego, permitiendo que el tensiómetro se encuentre entre los 30-40 cbars. Siendo ideal una precipitación anual entre 800-1,200 mm (Le Strange et al., 2010; Durán, 2013).

El cultivo se comporta como una planta de día largo, siendo necesario entre 11 a 13 horas de luz. Finalmente, se recomienda una humedad relativa de entre los 70 a 80 %, siendo importante no bajar más del 70% (Caizatoa, 2016).

Para el transplante es necesario que la planta tenga entre 30 y 35 días y entre 5 y 6 hojas verdaderas, de esta manera se garantiza la firmeza del tallo y una adecuada zona radicular. Se recomienda densidades de siembra de 54,000 plantas por hectárea, siendo una distancia adecuada entre hileras 65-70 cm y 30-35 cm plantas; importante sembrar de formar escalonada en el terreno, para así obtener una correcta planificación de producción (Le Strange et al. 2010 ; Caizatoa, 2016). La cosecha se debe realizar de forma manual para así conseguir un mejor tallado del florete. Además, el grano se debe encontrar en un estadio de entre fino y medio, idealmente realizar un corte de entre 6 a 8 pulgadas para favorecer el recorte de spears o lanzas, así como de los floretes (Durán, 2013).

Existen dos plagas principales en el brócoli. La primera, es el pulgón del brócoli (*Brevicoryne brassicae*) siendo importante tomar en cuenta su capacidad de transmitir enfermedades virales como el virus del mosaico de la coliflor en brasicas. El segundo, es la polilla de las crucíferas (*Plutella xylostella*), el cual causa raspones en el envés de la hoja, siendo posible encontrar perforaciones en las mismas. Normalmente, para su control se utilizan

productos con los siguientes ingredientes activos: Acefatos, Imidacloprid, Piramicarb, etc. (Oswaldo, 2011).

2.2 *Alternaria*

Alternaria spp. es un género de la familia Pleosporaceae, perteneciente al filo Ascomycota del reino Fungi; siendo su fase teleomórfica el género *Lewia* spp. Las enfermedades causadas por *Alternaria* son las más comunes a nivel mundial, poseyendo la capacidad de infectar hojas, tallos, flores y frutos. La mayoría de especies de *Alternaria* son saprófitos y patógenos, con la capacidad de formar cadenas de conidias con septas trasnversales y longitudinales. Micelio de color oscuro, con conidióforos cortos, simples y erectos (Agrios, 2005). Las enfermedades causadas por *Alternaria* en crucíferas normalmente son causadas por dos especies *A. brassicicola* y *A. brassicae* y ocasionalmente por *A. alternata* (Siciliano et al., 2017).

Los síntomas generalmente se presentan como tizones y manchas foliares que usualmente presentan una tonalidad negra-cafecina, son numerosas y largas, que normalmente se desarrollan por medio de anillos concéntricos. Constantemente, las hojas bajas y senescentes son las primeras en ser atacadas. Pero, la enfermedad presenta la capacidad de movilizarse hacia las partes aéreas de la planta, generando tonalidades amarillas en las hojas afectadas, que posteriormente, pueden secarse o desprenderse (Agrios, 2005).

La diseminación de *Alternaria* se genera normalmente, por medio de esporas que presentan la capacidad de diseminarse por medio del aire. Aumentando, su capacidad de reproducción cuando se presenta una alta frecuencia de lluvias y existen plantas o malezas contaminadas con dicha enfermedad. Las esporas, infectan a la planta al penetrar tejido susceptible directamente o por medio de heridas (Agrios, 2005).

Alternaria, presenta la capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios, toxinas y treinta micotoxinas, entre las que destacan el alternariol (AOH), alternariol metil eter (AME), altenueno (ALT), ácido tenuazónico (TA) y altertoxina-I (ATX-1) (Soma et al., 2019). Siendo estas últimas, las más importantes ya que pueden ser contaminantes naturales de alimentos, en especial cuando se consume de forma fresca, ya que podrían existir altas concentraciones de micotoxinas con la posibilidad de afectar la salud del consumidor. Es importante, tomar en cuenta, que cuando el alimento es previamente cocinado, este proceso puede afectar la estructura química de estos compuestos reduciendo así sus posibles efectos dañinos (Siciliano et al., 2018).

2.3 Calcio

El calcio es un macronutriente, que controla diferentes procesos en las plantas siendo esencial en las mismas. Su función principal es la de actuar como un mensajero intracelular envuelto en una gran variedad de respuestas ambientales y hormonales, formar parte de la pared celular y las membranas en su forma iónica (Ca^{2+}). Como un mensajero secundario, se encuentra envuelto en la fosforilación de las proteínas y por tanto tiene la capacidad de regular la actividad de un gran número de enzimas. Adicionalmente, regula el alargamiento celular, regulación estomálica, fortalecimiento de la pared celular y protección a plantas contra diversas enfermedades (Gutiérrez, 2017; Hopkins et al., 2009). La disponibilidad del calcio en el suelo se puede ver afectada por las propiedades del mismo, siendo ideal poseer un pH entre 6.5 y 7.3 (neutro), una capacidad de intercambio catiónico alta, para evitar que el Al^{3+} y el H^+ puedan llegar a ser cationes dominantes en el complejo de intercambio catiónico del suelo y bloquear su absorción (Jaramillo, 2014).

El xilema es el principal responsable de la movilización del calcio a través de la planta, el mecanismo de absorción se da principalmente por medio de una serie de intercambios de

cargas a través de varios sitios cargados negativamente dentro de la pared celular; que con la ayuda del agua y la transpiración regulan su movimiento. Estos sitios, se encuentran asociados con una serie de cationes divalentes, así como con calcio quelatado en la pared del xilema. Cabe aclarar, que la concentración de calcio en el floema es muy limitada y por tanto se dice que el calcio es inmóvil en el floema y traslocado únicamente hacia la planta a través del xilema (Miqueloto et al., 2014; Winkler et al., 2021).

El calcio se encuentra principalmente almacenado en el apoplasto y la vacuola de las células eucarióticas gracias a su tamaño y por su afinidad de almacenamiento. Logrando almacenar entre 50-150 μM (Ca^{2+}) en el apoplasto y >10 μM (Ca^{2+}) en la vacuola respectivamente. Debido a esta acumulación, y sumado al hecho de que el calcio posee un grupo de proteínas que permiten detectar y decodificar información. Posteriormente, se logra activar una cascada de reacciones bioquímicas por medio del conjunto de proteínas denominadas “EF hands motifs”, representado por las familias: calmodulina (CaM), calmodulin-like protein (CML), proteínas dependientes de kinasas (CDPKs) y calcineurina B (CBL) (Ranf et al., 2012; Zhang et al., 2020; Gutiérrez, 2017) . De esta forma, se logra reconocer señales en respuesta a dicha concentración y así generar un efecto en la inmunidad y crecimiento de las plantas (Zhang et al., 2020). El efecto de inmunidad se explica ya que las proteínas CaM-binding TF y CaM-binding Protein 60g (CBP60g) promueven la síntesis de la fitohormona del ácido salicílico (SA), la cual es conocida por promover rutas de defensa en las plantas (Ding y Ding, 2020).

2.3.1 Inducción de resistencia a patógenos

El calcio se encuentra naturalmente en el suelo por medio de partículas minerales como la lima, sílice, wollastonita y arcilla. En aplicaciones agrícolas, se utilizan fuentes de calcio como el silicato de calcio y el carbonato de calcio principalmente, para aumentar su contenido

(Hwang y Huh, 2022). Gracias a estas adiciones, el calcio ha mostrado la capacidad de inducir respuestas fisiológicas de defensa en las plantas frente al ataque de diversos patógenos. Según lo estudiado por Nolla et al., (2006) en el cultivo de soya contra el ataque de *Cercospora sojina* y *Peronospora manshurica*; se encontró, que adiciones de silicato de calcio induce resistencia al disminuir la incidencia un 40 % al incorporar 6000 kg/ha. Adicionalmente, Sun et al., (2020) investigando el cultivo de peras, hallaron que adiciones de cloruro de calcio al 1% reduce un 35% el diámetro de lesión causado por *Botryosphaeria dothidea*. Por el otro lado, otros autores (Bundó et al., 2017; Wang et al., 2019) estudiando el cultivo de arroz, encontraron que frente a la infección de *Magnaporthe oryzae* el calcio presenta la capacidad de disminuir la severidad, al estimular el flujo de calcio celular y posterior reducción de acumulación de peróxido de hidrógeno en las hojas del cultivo al interferir en el crecimiento del hongo necrótrofo.

2.4 Sistema Hidropónico: Nutrient Film Technique (NFT)

La hidroponía es un conjunto de técnicas que permite el crecimiento de plantas en la ausencia de suelo. Proviene del griego Hidro (agua) y Ponos (trabajo), por tanto, significa trabajo en agua. La hidroponía se basa en la utilización de sustratos (medios para dar sostén mecánico a la planta), soluciones nutritivas estáticas o circulantes, se logra suplir las necesidades de las plantas y por ende permitir su crecimiento. Gracias a estas técnicas se logra obtener hortalizas de excelente calidad y sanidad, así como un uso más eficiente de agua, luz y nutrientes (Beltrano y Gimenez, 2015).

El sistema hidropónico Nutrient Film Technique (NFT) es un sistema sin suelo, que se utiliza generalmente para el crecimiento de vegetales de hoja. En el cual se suministra soluciones nutritivas a las plantas siempre y cuando el nivel inicial de agua, se encuentre por debajo del set inicial, esta recircula y se inyecta directamente al sistema radicular de las plantas, a intervalos constantes y a una pendiente de 1/100. Bajo estas condiciones, las soluciones

nutritivas que no son absorbidas por las plantas regresan al tanque de solución inicial. De esta forma, es fácil calcular la absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas al medir la pérdida de nutrientes en los tanques (Son et al., 2020).

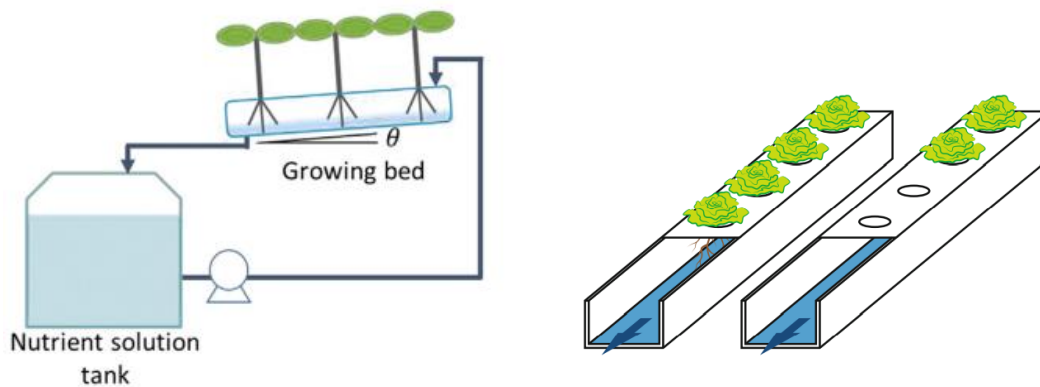


Figura 1. Diagrama esquemático de un sistema hidropónico Nutrient Film Technique (NFT).

Las principales ventajas que presenta este sistema son: la recirculación de nutrientes, la ausencia de substratos, gran potencial de automatización, ahorro de labores culturales en el cultivo (siembra y cosecha) y la oportunidad de manejar una óptima densidad de siembra. Por el otro lado, las principales desventajas que presenta este sistema es que, frente a la ausencia de substrato y bajos niveles de agua, se puede generar defectos en las bombas ya sea por obstrucciones o interrupciones en el suministro energético. Adicionalmente, la variación en la temperatura en las soluciones nutritivas puede generar estrés en las plantas y por ende mayor susceptibilidad a enfermedades. Finalmente, la principal limitante de este tipo de sistemas es que gran parte del sistema radicular se encuentra suspendido en aire, arriba del flujo de nutrientes, lo cual genera un rápido envejecimiento del tejido y posible pérdida de funcionalidad. Por ende, no se pueden producir cultivos que sobrepasen los 4-5 meses de ciclo de producción (Goddek et al., 2019).

2.5 Medio Nutritivo Hoagland

La solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950), es un medio nutritivo utilizado en sistemas hidropónicos, siendo uno de los más aplicados en el campo de la ciencia. Este medio, le proporciona a la planta con una proporción adecuada de macronutrientes y micronutrientes (Anexo A).

De forma general, este medio nutritivo sigue el principio de proveer a la planta, un exceso de disponibilidad de todos los elementos, para así evitar deficiencias nutricionales en el mismo. De esta forma, se genera un correcto balance entre los cationes divalentes, evitando la competencia en la absorción de la planta (Goddek et al., 2019). Importante, tomar en cuenta que el pH de las soluciones se debe regular a aproximadamente 6 ya sea por medio de la solución 0.1 N de H_2SO_4 o cualquier otra solución (Hoagland y Arnon, 1950) para garantizar la óptima disponibilidad de nutrientes.

Finalmente, la solución nutritiva de Hoagland es aún ampliamente utilizada para el crecimiento de plantas bajo sistemas hidropónicos. Permitiendo desarrollar estudios acerca de tolerancia a salinidad y metales pesados, fitoremediación de metales pesados, así como mejoras en los cultivos para la agricultura y la salud humana (Forde et al., 2004).

2.6 Microbioma

El microbioma se compone de todos los microorganismos presentes en un hábitat dado, asociado con un tipo de planta en específico y sus diferentes órganos (raíz, tallo, hojas, flores y frutos). Incluye la región de interacción del sistema radicular con el suelo que la rodea, conocido como rizosfera. La rizosfera, es la zona de influencia creada por las raíces y los microorganismos por medio de exudados. De esta forma, los exudados permiten la interacción planta-patógeno. Siendo importante, tomar en cuenta que este tipo de interacciones, expande el concepto previamente establecido de microbioma; ya que, el microbioma se compone de un

vasto número de genomas mucho más complejos que el genoma de la planta por sí sola. Por medio de la interacción entre ambos, estos genomas se convierten en una extensión de la genética de la planta (el segundo genoma de la planta) (Rout, 2014).

Las raíces liberan metabolitos primarios, como carbohidratos, amino ácidos, ácidos orgánicos y lípidos en forma de exudados para poder proveer de energía y nutrientes al microbioma del suelo. La composición y concentración de estos compuestos, varía significativamente cuando la planta se encuentra expuesta a un fitopatógeno. Por ejemplo, cuando *A. thaliana* es expuesta a una infección foliar de *Pseudomonas syringae* se incrementa la exudación del ácido L-malic que permite mayor colonización radicular. Es importante tomar en cuenta, que los metabolitos secundarios igual juegan un rol fundamental para el reclutamiento de disease-suppressive root/soil microbiomes. Ya que estos, son en menor medida sintetizados por los microorganismos del suelo y por tanto sirven como un buen estímulo de asociación (Rolfe et al., 2019).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar dietas nutritivas a base de calcio y consorcios microbianos como mecanismos de inducción de defensa frente a *Alternaria alternata*, por medio del sistema hidropónico NFT en brócoli

3.2 Objetivos Específicos

- Medir si dietas con exceso de calcio en brócoli generan cambios en el crecimiento y desarrollo del cultivo

- Evaluar si dietas con exceso de calcio en brócoli induce mecanismos de defensa frente al ataque de *A. alternata*
- Comprobar si consorcios microbianos fermentados en ácidos húmicos y fúlvicos, melaza y suero de leche inducen mecanismos de defensa frente al ataque de *A. alternata* en brócoli

3.3 Hipótesis

- Dietas nutritivas con exceso de calcio y consorcios microbianos, generan resistencia frente a *Alternaria alternata* en brócoli cultivados en un sistema hidropónico NFT.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento de *Alternaria*

4.1.1 Materiales para el aislamiento de *Alternaria*

- Cloro 1.25 %
- Etanol
- Hojas de Brócoli con síntomas de *Alternaria* spp.
- Colección 3.2 *Alternaria* spp Laboratorio de Biotecnología Agrícola USFQ
- Medio de Cultivo PDA
- Dextrose Agar
- Bacto Agar

4.1.2 Recolección de *Alternaria*

Se recolectó hojas de plantas de brócoli en un lote de la Granja Experimental de la carrera de Ingeniería en Agronomía de la USFQ. Se identificó la sintamología de acuerdo a lo establecido en (Agris, 2005). En el lote se muestrearon tres plantas de las cuales se colectaron las hojas que presentaban el daño. Se etiquetó y almacenó en fundas ziploc para previamente ser transportadas al laboratorio de Biotecnología agrícola de la carrera de Ingeniería en Agronomía de la USFQ. La cepa aislada únicamente se utilizó en este estudio para la identificación morfológica de *Alternaria* spp. Para los bioensayos se utilizó la cepa 3.2 de la colección de hongos del laboratorio de Biotecnología agrícola USFQ.

4.1.3 Desinfección de las muestras

En el laboratorio se lavó con agua abundante a las hojas de las plantas para eliminar cualquier remanente de tierra. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar (Biobase) se cortaron pequeños trozos de 10 mm de ancho y largo aproximadamente con la ayuda de un bisturí estéril. Así mismo, se desinfectó las muestras con cloro al 1.29 % por un lapso de 45 segundos, se lavó con agua destilada; y se realizó una inmersión en etanol por 1 min, a continuación se lavó con agua destilada. Finalmente, en cada paso el exceso de líquido fue eliminado con papel estéril (Siciliano et al., 2018).

4.1.4 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados para el aislamiento de *Alternaria* fueron de PDA y ½ PDA (Sayma et al., 2022). Para la elaboración del medio se utilizó potato dextrose agar a una concentración 39 g/L y Bacto Agar 15 g/L respectivamente; para ½ PDA se utilizó los mismos productos pero a la mitad de su concentración. Se aforó a 1 L con agua destilada y se disolvió en una plancha agitadora por un lapso aproximado de 15 min. A continuación, se autoclavó el medio a 121 °C y 20 min por medio de la autoclave (UTKBS-Solv). Finalmente, con la ayuda

de una cámara de flujo laminar (Biobase) se repartieron los medios en cajas petri previamente colocando Gentrax 160 a una dosis de 2 ml/L para evitar el crecimiento de bacterias en los mismos.

4.1.5 Inoculación de *Alternaria* en medio PDA

Para la inoculación y replicación de *Alternaria*, se utilizaron los medios previamente descritos y con la ayuda de palillos estériles se tomó micelio de la cepa 3.2 que se inoculó en las cajas petri. Para la inoculación de la cepa recolectada en la granja experimental, se sembró las hojas de 10 mm con síntomas del patógeno en los mismos medios. En ambos casos, se recubrieron las cajas petri con papel aluminio y se incubó a 28 °C por un lapso de 14 días en total oscuridad (Pavón et al., 2010).

4.1.6 Inoculación de *Alternaria* en hojas de brócoli

Para la inoculación de *Alternaria* en las hojas de brócoli, se tomaron las cajas petri de PDA con *Alternaria*, y se llenó con solución salina al 0.9 % a las mismas. Con la ayuda de un isopo autoclavado, se raspo abundantemente el micelio del hongo con el objetivo de liberar las esporas presentes en el mismo. A continuación, se traspasó todo el líquido más el hongo a un Erlenmeyer de 125 ml, en donde se filtró con fibra de vidrio las impurezas. De ahí se extrajo 10 µL con la ayuda de un micropipeta y se colocó en la cámara de Neubauer; con la ayuda de un microscopio electrónico (Leica DM1000) y un aumento de 100 (X) se calibró la concentración de 1×10^6 UFC/ml. Finalmente, se inoculó 10 µL de dicha concentración a cada hoja de brócoli en cada uno de los diferentes bioensayos (Sayma et al., 2022).

4.2 Bioensayo inducción resistencia calcio

4.2.1 Materiales para la siembra y cultivo de *Brassica oleracea* var. *italica* híbrido Domador

- Plántulas de *B. oleracea* híbrido Domador

- Conductímetro (HANNA H198130)
- Medio de cultivo Hoagland
- Cajas Sistemas Hidropónicos tipo Nutrient Film Technique (Anexo M)
- Temporizador analógico 1 evento (Voltech)
- Aspersor

4.2.2 Siembra, cultivo y condiciones del bioensayo

La investigación fue realizada desde el 24 de enero del 2022 hasta el 25 de febrero del 2022. El experimento se ubicó en el invernadero de la USFQ, el cual tiene una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ y $80\% \pm 10$ de HR (Obtenido de Data Logger RC-61). En este proceso, se realizó un riego manual de 10 (ml) de agua destilada por medio de un aspersor todos los días a las plantas de brócoli, la fertilización se realizó en base a medio Hoagland (Anexo B) elaborado por medio del producto comercial NewPonia A y NewPonia B (Microtech) (Anexo N), con una conductividad eléctrica de 1 dS/m y un pH de 5.7, por medio de un sistema hidropónico tipo NFT. Para la siembra de las plantas en el sistema hidropónico, se utilizó canastillas de plástico y esponjas en conjunto con plántulas de brócoli del híbrido Domador, que previamente fueron lavadas para eliminar los restos del sustrato. En este primer bioensayo se sembraron 66 plantas distribuidas en sistemas hidropónicos NFT independientes de 11 plantas cada uno. El fotoperíodo aplicado fue de 12 h luz/12 h oscuridad utilizando focos led. Iniciando los riegos a las 5 a.m con pulsos de 30 min cada dos horas hasta las 7 p.m., por medio de un temporizador analógico de un evento; por un lapso de tiempo de 3 semanas, para posteriormente, asignar una dieta específica a cada tratamiento por un lapso de 9 días. Importante tomar en cuenta que antes de cambiar a las nuevas dietas, se limpió con agua de botellón los hidropónicos y se mantuvo por 24 h en esta agua antes de cambiar a las nuevas dietas. Finalmente, se inoculó con *Alternaria* a tres hojas de cada planta de brócoli por un lapso de nueve días (Anexo J).

4.2.3 *Diseño experimental y soluciones bioensayo calcio*

El diseño experimental utilizado Completamente al Azar (DCA) con seis tratamientos y 11 repeticiones, el experimento constó con un total de 66 unidades experimentales ubicados aleatoriamente en el invernadero de la USFQ. Cada una de las unidades experimentales constó de una canastilla hidropónica, que contenía una planta de brócoli del híbrido Domador sembrado en un sistema hidropónico NFT.

Los tratamientos y las dietas utilizadas, se numeraron de forma aleatoria como:

- Testigo + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Testigo – Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Calcio + Patógeno / Dieta (Anexo C)
- Calcio – Patógeno / Dieta (Anexo C)
- Hoagland 5x + Patógeno / Dieta (Anexo D)
- Hoagland 5x – Patógeno / Dieta (Anexo D)

Las variables analizadas fueron las siguientes:

- Longitud raíz cm: Para la medición de esta variable, se utilizó una regla de 30 cm, se midió el sistema radicular desde la base hasta la raíz más larga, al final del bioensayo.
- Longitud hojas cm: Se utilizó una regla de 30 cm, se midió tres hojas por planta longitudinalmente desde la base de la nervadura central, hasta la parte apical de la hoja; seis veces a lo largo de la experimentación.
- Peso fresco gr: Para la cuantificación, se utilizó una balanza analítica (Ohaus Espectrocroma). Se registraron los pesos de forma semanal.
- Peso seco gr: Para la mediación de esta variable, se utilizó una incubadora (Shysc Shaking Incubator) a 60°C en donde se colocaron las plantas enteras una

vez terminada la experimentación por un lapso de 72 h. Una vez culminado este tiempo, se utilizó una balanza analítica y se registró los pesos.

- Incidencia: Se calculó un porcentaje de infección causado por el hongo *Alternaria alternata* sobre el total de hojas infectadas (3 en cada planta y 33 por tratamiento).
- Severidad: Para la medición, se realizó una escala de severidad (Anexo E). La cual fue utilizada al finalizar el bioensayo para determinar el nivel de infección de *A. alternata* sobre las hojas de brócoli.

Las pruebas y programas estadísticos utilizados, se describen a continuación para cada variable:

- Prueba t-Student ($p < 0.05$): Longitud raíz, Longitud de hojas, Peso fresco, Peso seco y Longitud de Hojas
- ANOVA de un factor: Peso fresco
- Transformación de raíz cuadrada + 0.5: Peso fresco
- Chi-cuadrado por asociación (p variable): Severidad
- Programas Estadísticos: Minitab 19 y Microsoft Excel 2016.

4.3 Bioensayo inducción de resistencia microbiomas

4.3.1 Materiales para la siembra y cultivo de Brassica oleracea var. italica híbrido Coronado

- Plántulas de *B. oleracea* híbrido Coronado
- Conductímetro (Hanna H198130)
- Medio de cultivo Hoagland
- Cajas Sistemas Hidropónicos tipo Nutrient Film Technique (Anexo M)
- Temporizador analógico 1 evento (Voltech)
- Aspersor

4.3.2 Siembra, cultivo y condiciones del bioensayo

La investigación fue realizada desde el 17 de marzo del 2022 hasta el 25 de abril del 2022. El experimento se ubicó en el invernadero de la USFQ, el cual tiene una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ y $80\% \pm 10$ de HR (Obtenido de Data Logger RC-61). En este proceso, se realizó un riego manual diario de 10 (ml) de agua destilada por medio de un aspersor a las plantas de brócoli, la fertilización se realizó en base a medio Hoagland (Anexo B) elaborado por medio del producto comercial NewPonia A y NewPonia B (Microtech) (Anexo N), con una conductividad eléctrica de 1 dS/m y un pH de 5.7, por medio de un sistema hidropónico tipo NFT. Para la siembra de las plantas en el sistema hidropónico, se utilizó canastillas de plástico y esponjas con plántulas de brócoli del híbrido Coronado, que previamente fueron lavadas para eliminar los restos del sustrato. En este segundo bioensayo, se sembraron 132 plantas distribuidas en sistemas hidropónicos NFT independientes de 11 plantas cada uno. El fotoperiodo aplicado fue de 12 h luz/12 h oscuridad utilizando focos Led. Iniciando los riegos a las 5 a.m con pulsos de 30 min cada dos horas hasta las 7 p.m., por medio de un temporizador analógico de un evento; por un lapso de tiempo de 2 semanas, para posteriormente, asignar un microbioma específico a cada tratamiento por un período de 7 días, para permitir el establecimiento del consorcio microbiano en el sistema radicular de las plantas. Finalmente, se inoculó con *A. alternata* a las plantas en la tercera semana de crecimiento, por 6 días, para realizar una segunda inoculación, que tuvo una duración de 13 días (Anexo K).

4.3.3 Formación de microbiomas

Para la obtención de los 11 diferentes consorcios microbianos, se partió de un suelo obtenido en Tufiño (provincia del Carchi, Ecuador) que previamente mostró resistencia al ataque de patógenos, conservado en el laboratorio de Biotecnología agrícola USFQ (Pazmiño, 2021). Posteriormente, se preparó una solución en base a Melaza 0.05 %, Suero de Leche 0.05

% y Brumik 0.05 % (Microtech) (Anexo F), como fuente de alimentación para cada uno de los consorcios. Se preparó 11 alicuotas diferentes en Erlenmeyers de 80 ml, que contenían 72 ml de la solución previamente descrita y 8 g de suelo de Tufiño. Se incubó a 28 °C y 180 rpm y cada dos días de incubación se traspasó 8 ml de dicha solución a un nuevo Erlenmeyer que contenía 72 ml de solución renovada. Se realizó el paso anterior nueve veces antes de inocular a los sistemas hidropónicos a una concentración del 10 % (Anexo L).

4.3.4 Diseño experimental bioensayo microbioma

El diseño experimental utilizado fue Completamente al Azar (DCA) con 12 tratamientos y 11 repeticiones, el experimento constó con un total de 132 unidades experimentales ubicados aleatoriamente en el invernadero de la USFQ. Cada una de las unidades experimentales constó de una canastilla hidropónica, que contenía una planta de brócoli del híbrido Coronado sembrado en un sistema hidropónico NFT.

Los tratamientos y las dietas utilizadas, se numeraron de forma aleatoria como:

- Testigo + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 1 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 2 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 3 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 4 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 5 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 6 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 7 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 8 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 9 + Patógeno / Dieta (Anexo B)
- Microbioma 10 + Patógeno / Dieta (Anexo B)

- Microbioma 11 + Patógeno / Dieta (Anexo B)

Las variables analizadas fueron las siguientes:

- Incidencia: Se calculó un porcentaje de infección causado por el hongo *Alternaria alternata* sobre el total de hojas infectadas (2 en cada planta y 22 por tratamiento).
- Severidad: Se cuantificó mediante una escala de severidad (Figura 2). La cual fue utilizada al finalizar el bioensayo para determinar el nivel de infección de *A. alternata* sobre las hojas de brócoli.

Las pruebas y programas estadísticos utilizados, se describen a continuación para cada variable:

- Chi-cuadrado por asociación (p variable): Severidad
- Programas Estadísticos: Minitab 19 y Microsoft Excel 2016.



Figura 2. Escala de cinco grados de severidad obtenida a partir del bioensayo microbioma realizado.

V. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de *Alternaria alternata*

5.1.1 Identificación microscópica y macroscópica

El hongo patógeno *A. alternata* presentó un micelio verde-algodonoso en el anverso del medio PDA y ½ PDA. En el reverso se observó un color negro-cafecino. El micelio observado a 40(x) mostró ser septado (Tabla 1). Las conidias fueron largas, septadas, con forma de pera, de color cafecino-oscuro con paredes longitudinales y trasnversas. Las esporas fueron blancequicinas, pequeñas y esféricas (Tabla 2).

Tabla 1. Morfología macroscópica de *Alternaria alternata* en medio PDA

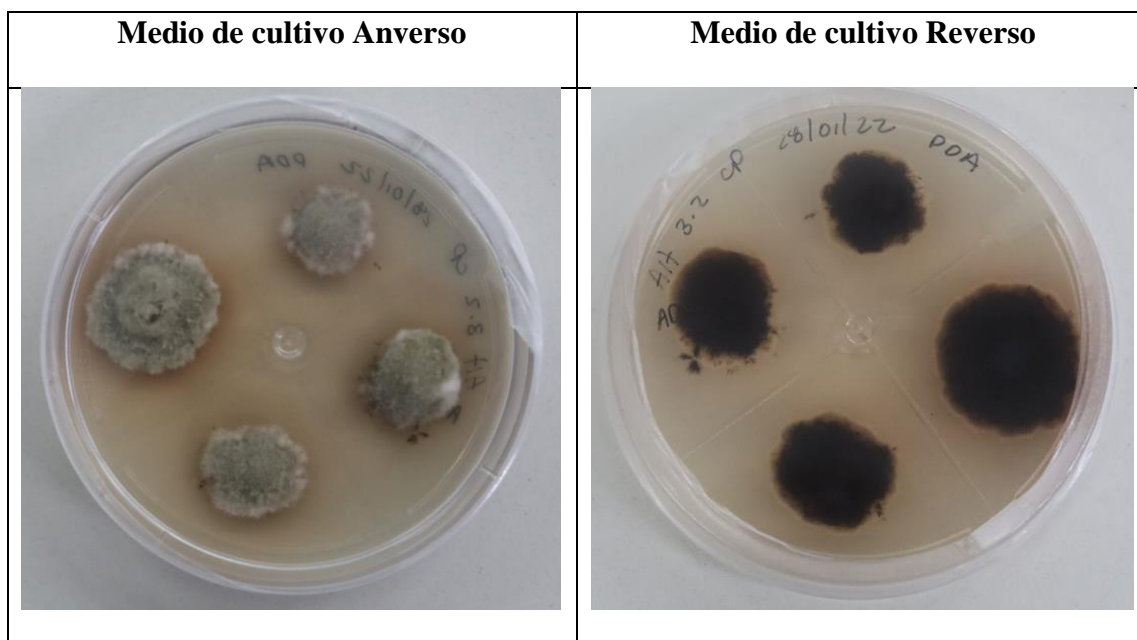
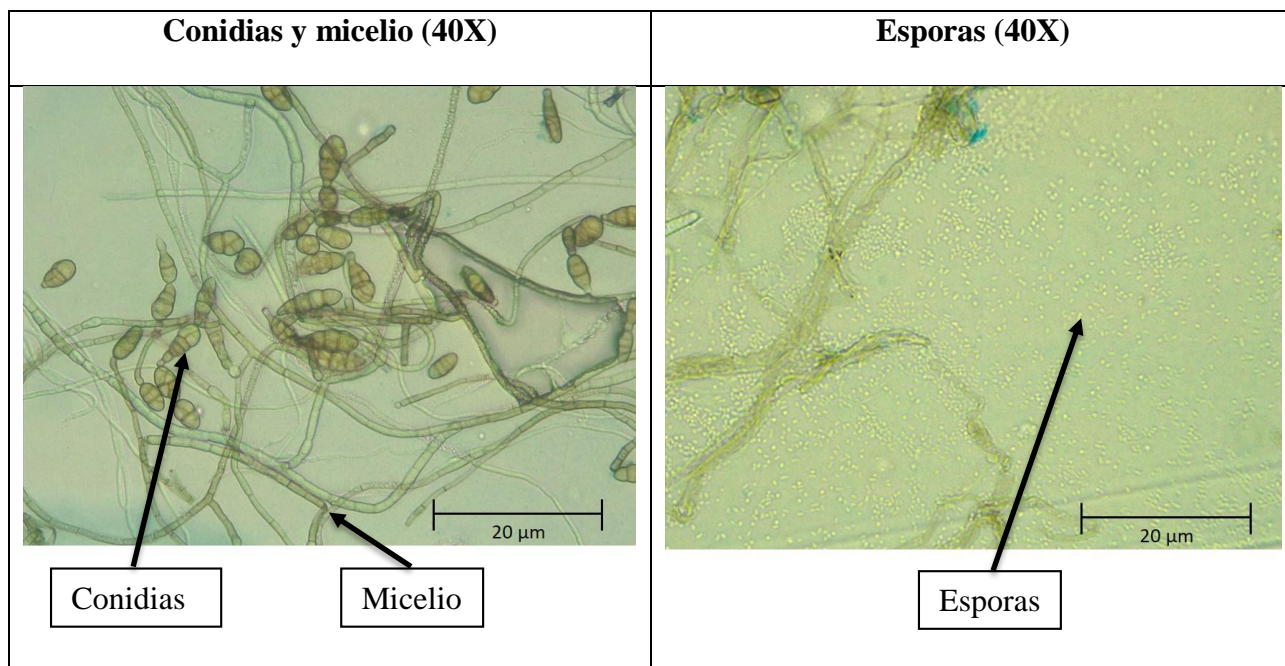


Tabla 2. Morfología microscópica de *Alternaria alternata* en medio PDA

5.2 Bioensayo inducción de resistencia calcio

5.2.1 Crecimiento raíz

Con base a la prueba de t-Student ($p < 0.05$) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos al comparar con el testigo sin patógeno. En base a las medias mostradas por los tratamientos calcio – P y Hoagland 5x –P, se observó que presentan el mayor crecimiento radicular. Por el contrario, calcio + P y Hoagland 5x + P poseen el menor crecimiento radicular (Figura 3).

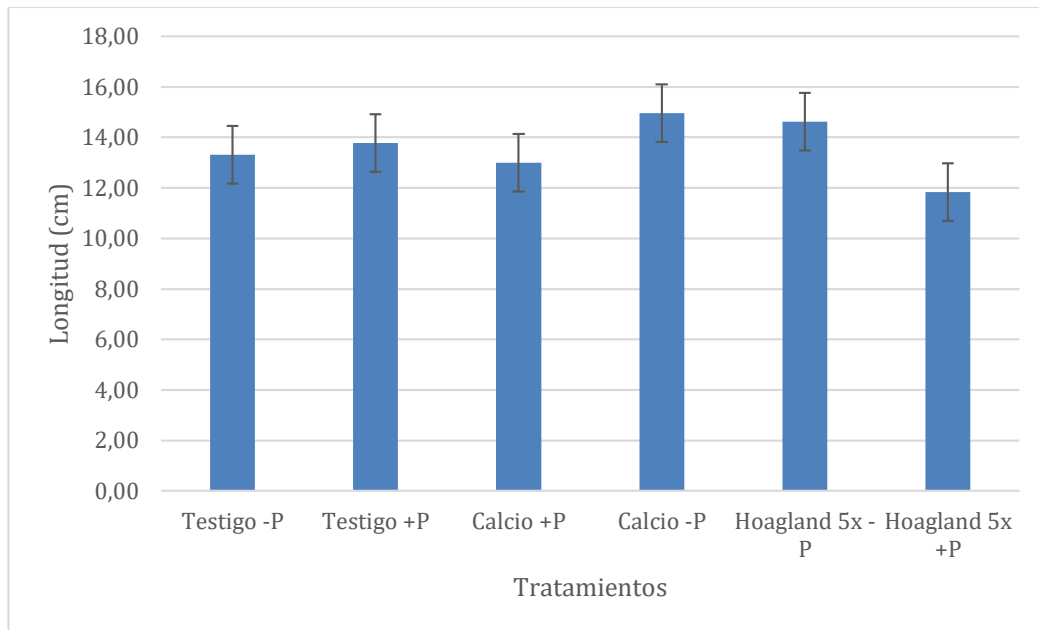


Figura 3. Crecimiento raíz en plantas del híbrido Dominador cm durante tratamientos de Calcio y exceso de nutrientes. *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).

5.2.2 Longitud hojas

Con base a la prueba de t-Student ($p < 0.05$) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos al comparar con el testigo sin patógeno a lo largo de toda la etapa de crecimiento del cultivo. Por tanto, se acepta la hipótesis nula “Diferentes dietas no afectan al crecimiento de hojas de plantas de brócoli bajo un sistema NFT.” De acuerdo a lo que se observa en la Figura 4, se ratifica las diferencias mínimas entre las medias de los tratamientos.

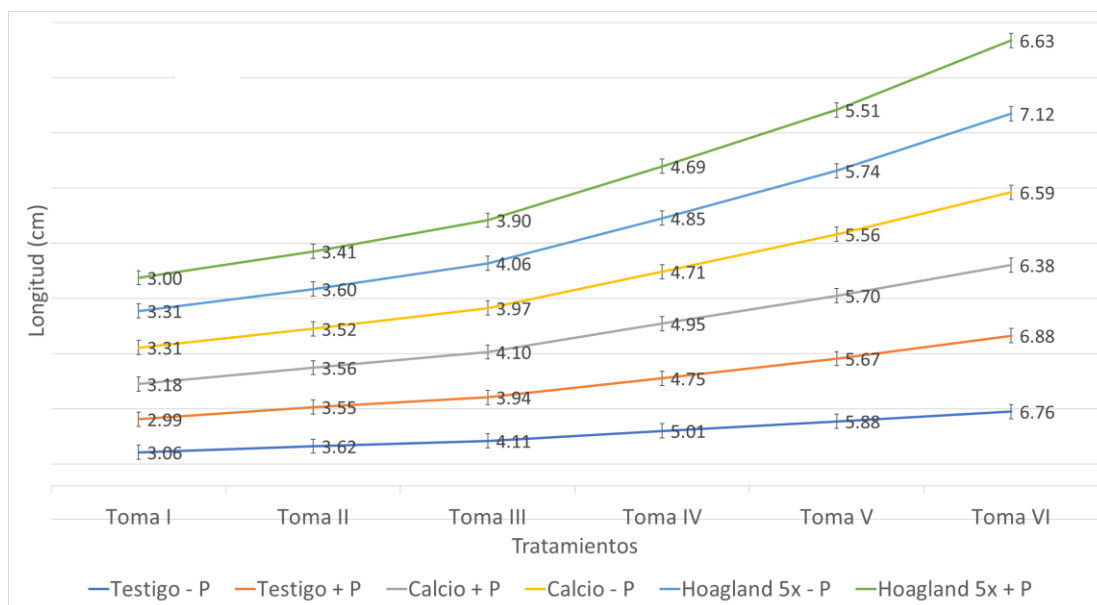


Figura 4. Crecimiento hojas en plantas del híbrido Domador cm por un periodo de 5 semanas, durante tratamientos de Calcio y exceso de nutrientes. *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).

5.2.3 Peso fresco

Con base a la prueba de de t-Student ($p < 0.05$) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos al comparar con el testigo sin patógeno. En base a las medias registradas, se observó que los tratamientos Hoagland 5x $-/+$ P presentan las medias más altas de peso fresco luego de 33 días de crecimiento. Por el contrario, los tratamientos Calcio $-/+$ P presentaron el menor peso fresco final (Figura 5). El valor F del ANOVA (Anexo G) realizado, muestra que no existen diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos. Por tanto, se acepta la hipótesis nula “Diferentes dietas no afectan al peso fresco de plantas de brócoli bajo un sistema NFT.”

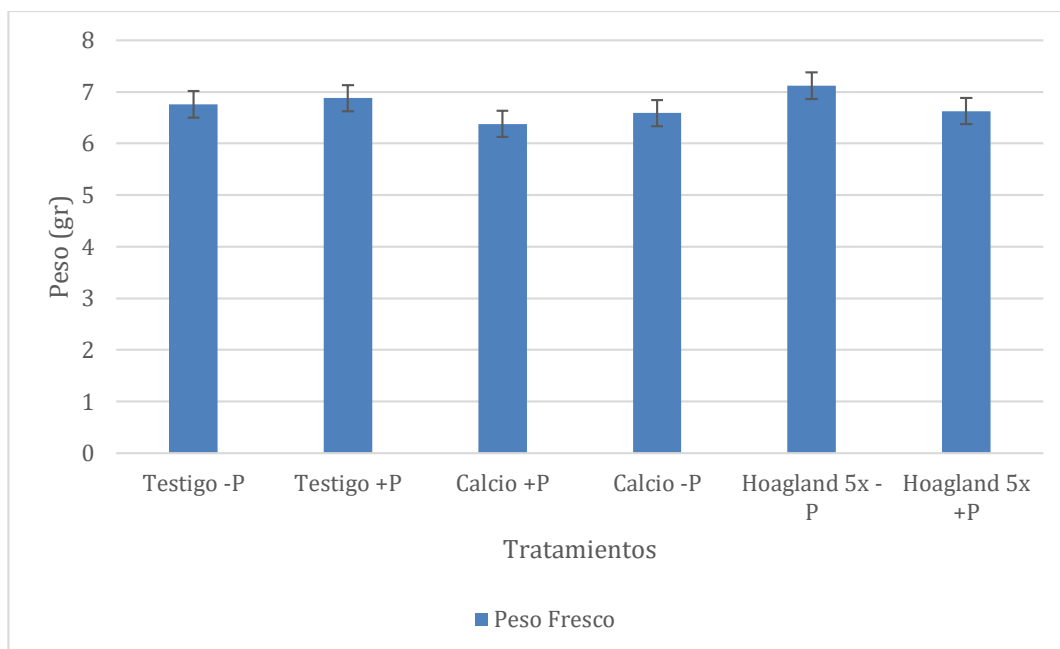


Figura 5. Peso fresco final en plantas del híbrido Domador gr durante tratamientos de Calcio y exceso de nutrientes. *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).

5.2.4 *Peso seco*

Con base a la prueba de t-Student ($p < 0.05$) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos al comparar con el testigo sin patógeno. En base a las medias presentadas, se puede observar que la acumulación de materia seca es muy similar para todos los tratamientos, por tanto, ninguna dieta tiene efecto en esta variable (Figura 6).

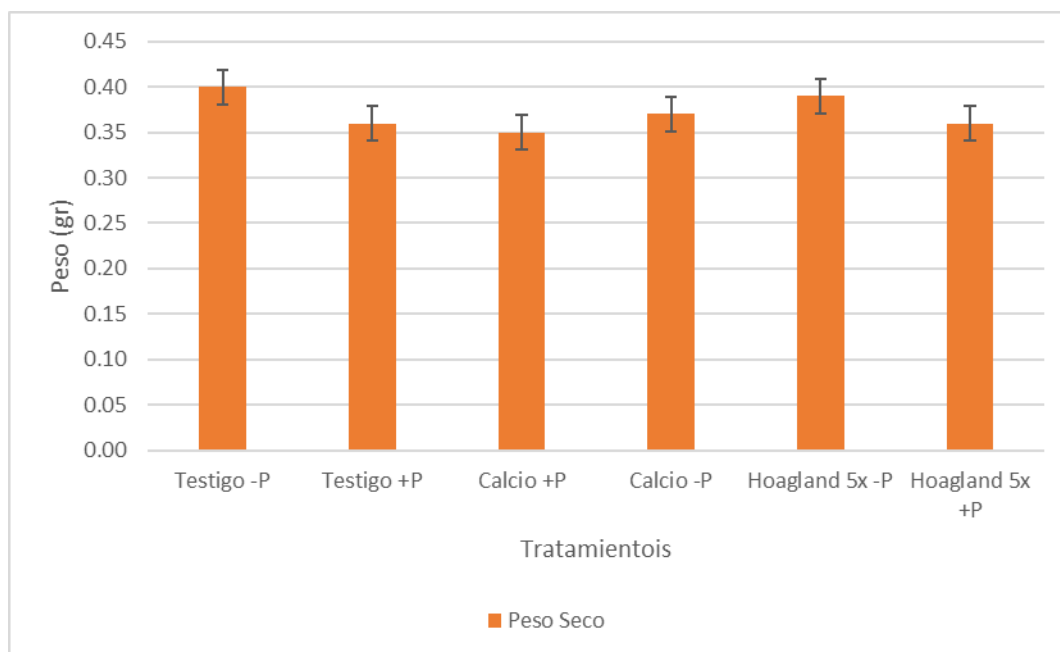


Figura 6. Peso seco en plantas de híbrido Domador gr luego de 72 h a 60 °C, expuestas a tratamientos de Calcio y exceso de nutrientes. *Diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0.05$).

5.2.5 Incidencia *Alternaria alternata*

El porcentaje de infección de las hojas de brócoli para los diferentes tratamientos mostró diferencias. El tratamiento Hoagland 5x+P resultó ser el que menor ataque presentó del patógeno, mientras que el tratamiento de Calcio +P resultó igual que el testigo en porcentaje de hojas afectas (Figura 7). Importante, resalta que el tratamiento testigo -P no mostró ninguna sintamología de daño, debido a que no se encontraba inoculado.

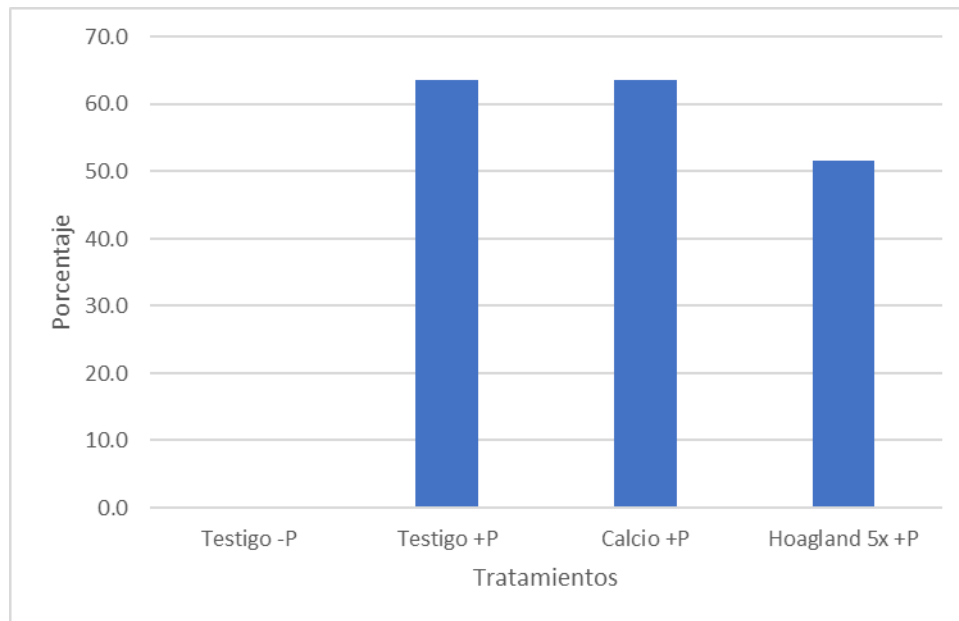


Figura 7. Incidencia de infección de hojas de brócoli híbrido Domador como respuesta a la inoculación con *A. alternata* a una concentración de 1×10^6 UFC/ml durante 9 días, bajo dietas de Calcio y exceso de nutrientes.

5.2.6 Severidad de *Alternaria alternata*

Con base a la prueba de chi-Cuadrado por asociación y al valor $p < 0.001$ obtenido (Anexo H), se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Por tanto, se puede aceptar la hipótesis alternativa “Dietas nutritivas con exceso de calcio, generan resistencia frente a *Alternaria alternata* en brócoli cultivado en un sistema hidropónico NFT.” De igual manera, el tratamiento de Calcio + P no presentó severidad del nivel 4 y obtuvo un mayor porcentaje de nivel 2 comparado con el control. Adicionalmente, el tratamiento Hoagland 5x + P mostró menor porcentaje de severidad 4 con respecto al control y mayor severidad 1 respectivamente (Figura 8).

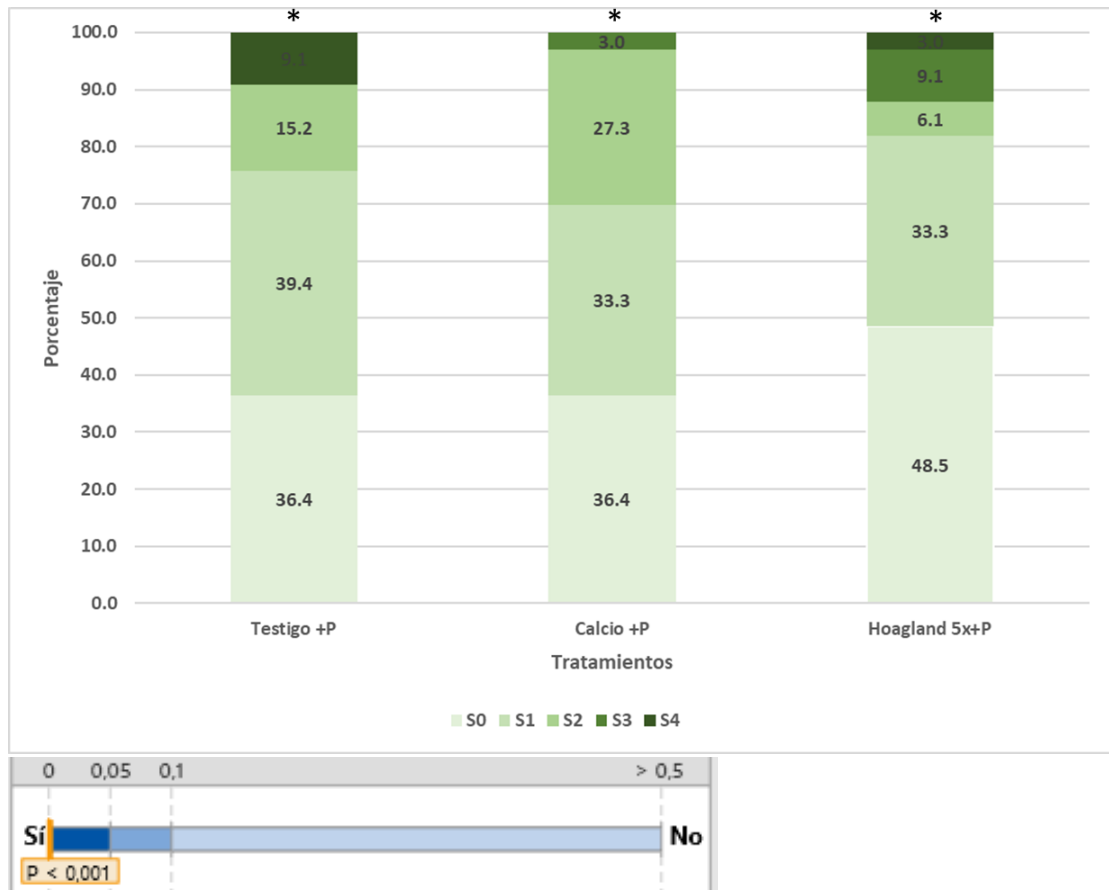


Figura 8. Severidad de infección de hojas de brócoli debido a inoculación con *A. alternata* a una concentración de 1×10^6 UFC/ml durante 9 días, expuestas a dietas de Calcio y exceso de nutrientes. * El análisis estadístico se basó en un Chi-cuadrado por asociación (p variable).

5.3 Bioensayo inducción de resistencia microbiomas

5.3.1 Incidencia *Alternaria alternata*

El porcentaje de infección de las hojas de brócoli para los diferentes tratamientos mostró diferencias en los porcentajes de infección. Los tratamientos del Microbioma 1, 3, 6, 7, 8 y 11 + Patógeno resultaron ser los que menor ataque del patógeno mostraron, sobre todo, el tratamiento Microbioma 3 +P que presentó un 0.0 % de incidencia. Por el otro lado, los tratamientos Microbioma 9, 4 y Testigo + Patógeno presentaron la mayor incidencia de infección por parte del hongo en un rango entre el 40 y 64 % (Figura 9).

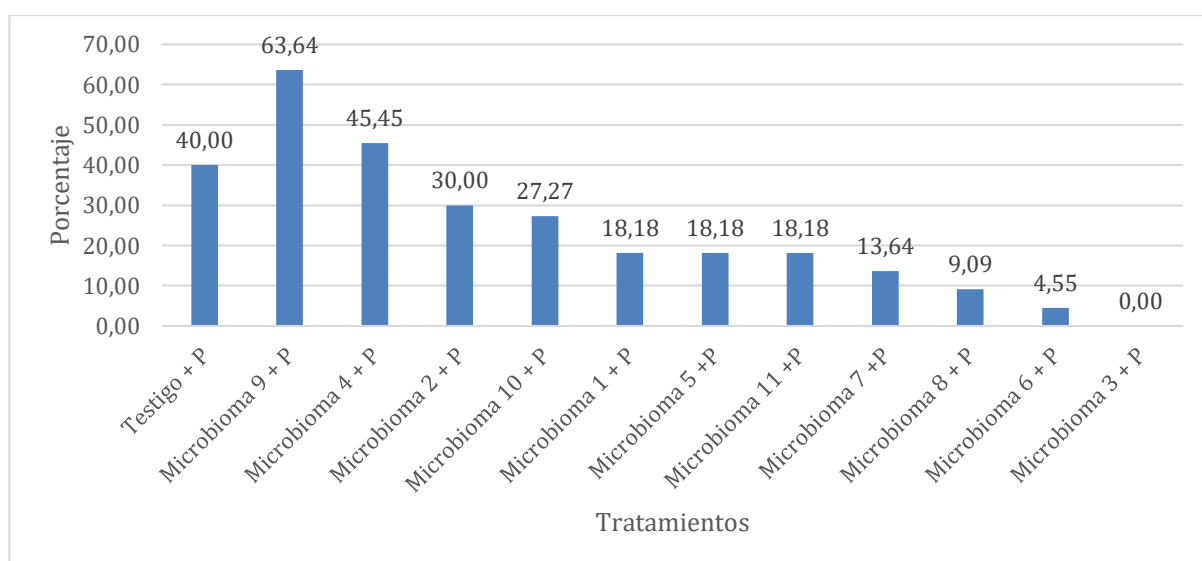


Figura 9. Incidencia de infección de hojas de brócoli híbrido Coronado como respuesta a la inoculación con *A. alternata* a una concentración de 1×10^6 UFC/ml, durante 22 días de infección, expuestas a diferentes consorcios microbianos.

5.3.2 Severidad de *Alternaria alternata*

Con base a la prueba de chi-Cuadrado y con una probabilidad de $p < 0.001$ obtenido (Anexo I), se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Por tanto, se puede aceptar la hipótesis alternativa “Consortios microbianos, generan resistencia frente a *Alternaria alternata* en brócoli cultivado en un sistema hidropónico NFT.” Adicionalmente, los tratamientos del Microbiona 3, 6 y 8 + Patógeno, mostraron la mayor respuesta de resistencia al presentar un 100, 95.5 y 90.9 % respectivamente de infección nivel cero. Por el otro lado, los tratamientos Microbioma 9, 10 y Testigo + Patógeno mostraron una severidad con una escala entre tres y cuatro respectivamente (Figura 10). Importante tomar en cuenta, que el único consorcio microbiano que no mostró diferencias estadísticas frente al testigo fue el microbioma dos.

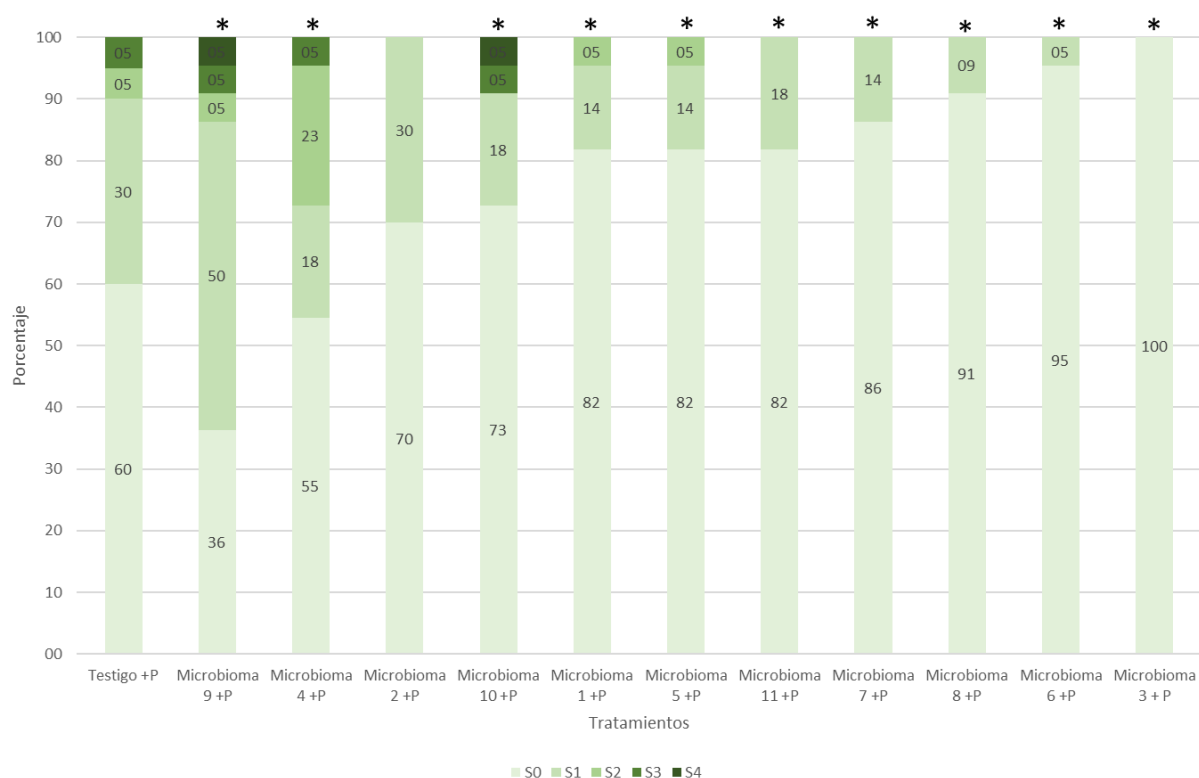


Figura 10. Severidad de infección de hojas de brócoli debido a inoculación con *A. alternata* a una concentración de 1×10^6 UFC/ml, durante 22 días de infección, expuestas a

diferentes consorcios microbianos. * El análisis estadístico se basó en un Chi-cuadrado por asociación (p variable).

VI. DISCUSIÓN

6.1 Bioensayo inducción de resistencia calcio

6.1.1 Crecimiento plantas de brócoli híbrido Coronado

Los resultados presentados en la Figura 3, muestran que los tratamientos con Calcio +/- P (12.99 y 14.95 cm) y Hoagland 5x +/- P (11.83 y 14.62 cm) no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el testigo más patógeno (13.77 cm) para la variable de crecimiento de raíz. Lo cual indica que dietas con pulsos con exceso de calcio y sales en la fertilización de plantas de brócoli no inducen a un mayor crecimiento del sistema radicular. En este mismo aspecto, Espinoza et al., (2021), reportaron que no existen un aumento significativo en el crecimiento del sistema radicular en plantas de brócoli frente al ataque de un patógeno, cuando existe un aumento en la dieta nutricional de calcio en una temporada seca.

Por el otro lado, la elongación de las células de las hojas de brócoli se ve influenciado por factores externos como la temperatura, fitohormonas (auxinas y giberelinas) y luminosidad. En el presentes estudio, se encontró que en el tratamiento Calcio + P la longitud de las hojas final fue de 6.38 cm y en el tratamiento de Hoagland 5x + P de 6.38 cm respectivamente (Figura 4). Comparado con el testigo con patógeno (6.88 cm), no existe diferencia estadística entre los tratamientos y, por tanto, no se observó una relación entre el aumento de calcio y el crecimiento de las hojas. Según Kou et al., (2014), adiciones de calcio pueden generar una disminución en la extensibilidad del tejido debido a la unión entre los grupos carboxílicos pécticos y la pared celular. Adicionalmente, esta inhibición o estimulación del hipocótilo de las células de las plantas de brócoli podría ser dependiente a la dosis suministrada; bajas concentraciones de calcio si estimulan la elongación pero altas dosis son inhibitorias.

Adiciones de calcio en las dietas nutricionales de las plantas, no alteran el metabolismo de las plantas, ya que no generan una variación significativa en la eficiencia y/o rendimiento del fotosistema II. Los resultados del presente estudio, muestran que la acumulación de materia seca y fresca en el tratamiento Calcio + P (0.35 g y 6.38 g respectivamente) no son diferentes al testigo más patógeno (0.36 g y 6.88 g respectivamente) (Figuras 5 y 6). Por otro parte, otros autores estudiando las respuestas fisiológicas de adiciones calcio en el cultivo de soya, encontraron que los valores normales del fotosistema II, se encuentran entre 0.75-0.85 Fv/Fm a pesar de suministrar pulsos adicionales de calcio (Couto, 2014). Finalmente, según los resultados obtenidos por Couto (2018), no existe una relación entre el aumento de la concentración de calcio en la fertilización de las plantas y la asimilación líquida de CO₂; explicado, por una menor apertura estomática y por tanto menor disponibilidad de CO₂ para el ciclo de Calvin, y consecuentemente, una menor tasa fotosintética en las plantas. Lo cual podría explicar porque adiciones de calcio, no necesariamente influyen en el peso final de las plantas.

6.1.2 Incidencia y Severidad de *A. alternata*

La incidencia de *A. alternata* en el presente estudio mostró ser del 63.6 % para el tratamiento de Calcio + P y Testigo + P, por el otro lado, el tratamiento Hoagland 5x + P obtuvo un valor de 51.5 % respectivamente (Figura 7). Los resultados obtenidos para incidencia, son un primer paso para entender si pulsos con exceso de calcio y sales permiten una inducción de resistencia frente al ataque de un patógeno. Es por ello, que se analizó la severidad, en donde se encontró que el tratamiento testigo + P, fue el que mayor severidad 4 obtuvo con 9.1(%) y menor acumulación de severidad 1 y 2 (90.9 %) respectivamente (Figura 8), En comparación, con el tratamiento de calcio que obtuvo 0 % severidad 4 y 97 % de acumulación de severidad 0, 1 y 2; así mismo, el tratamiento de Hoagland 5x obtuvo un 3 % de severidad 4, y a pesar de obtener una acumulación de 87.9 % de severidad 0, 1 y 2 muestra menor grado de

severidad 4 como se indicó anteriormente. Al aplicar la prueba de Chi-cuadrado, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y por tanto, se puede concluir que dietas con exceso de calcio y sales si inducen resistencia frente al ataque de *A. alternata* en plantas de brócoli.

Los resultados obtenidos por Bundó y Coca (2017), al estudiar el ataque de *A. alternata* en el cultivo de arroz, mostraron ser similares, al obtener un 40 % de infección de área para el tratamiento con exceso de calcio y 60 % para el testigo. Otros autores, estudiando el cultivo de soya, encontraron que fertilizaciones con exceso de calcio 12 Mg/ha disminuye de un 85 % a un 65 % la incidencia de *Peronospora manshurica* y la severidad de *Sclerotinia sclerotiorum* de un 40 % (Testigo sin Ca) a < 20 % para el tratamiento con exceso de calcio (Nolla et al., 2006; Arfaoui et al., 2018).

Llerena (2019), indica que los pulsos con exceso de calcio aumenta la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* en 5000 y 1000 respectivamente en comparación con un control sin calcio. Explicado por el flujo de calcio que se genera hacia la célula y que, posteriormente, al ser estos genes los principales marcadores de la ruta del JA; se activa la expresión de defensa en las plantas. Lo cual, podría explicar a nivel molecular por qué dietas con exceso de calcio, pueden generar defensa frente al ataque de un patógeno como *A. alternata*.

6.2 Bioensayo inducción de resistencia microbiomas

6.2.1 Incidencia y Severidad de A. alternata

La incidencia de *A. alternata* en el presente estudio mostró una tendencia variable, de acuerdo al tipo de consorcio microbiano al que fueron expuestas las plantas. Los consorcios 9, 4, 2 y 10 mostraron la peor inducción de resistencia, en conjunto con el testigo 40%, al alcanzar valores de infección del 64.6, 45.5, 30.0 y 27.3 % respectivamente. Por el otro lado, los consorcios 8, 6 y 3 mostraron la mejor inducción de resistencia al reducir el porcentaje de

incidencia al 9.1, 4.5 y 0 % respectivamente (Figura 9). Indudablemente, los resultados obtenidos para incidencia son un primer paso para entender si consorcios microbianos permiten una inducción de resistencia frente al ataque de *Alternaria*. Es por ello, que se analizó la severidad, en donde se encontró nuevamente que los tratamientos 8, 6 y 3 generan el menor grado de infección, ya que en todos los casos el porcentaje de severidad 2, 3 y 4 fue del 0.0 % respectivamente (Figura 10). Lo que indica un alto grado de resistencia, cuando se genera la asociación entre el consorcio y los mecanismos de defensa propio de las plantas, bloqueando el desarrollo de la enfermedad e incluso suprimiéndolo.

Los resultados obtenidos por Pazmiño (2021), al estudiar el ataque de *Alternaria* spp. en el cultivo de brócoli, mostraron ser similares, al obtener un 0 % de severidad tres y cuatro respectivamente al cultivar las plantas bajo un suelo agrícola. Explicado por una alta concentración de bacterias del género *Pseudomonas* sp. del orden 1×10^4 UFC/ml. Las cuales son conocidas por ser microorganismos promotores del crecimiento vegetal, así como por el establecimiento de interacciones positivas entre las raíces de las plantas (Sánchez, 2017).

Por el otro lado, una posible explicación del porqué ciertos consorcios promovieron el desarrollo de la enfermedad, es por la metodología de selección artificial de la comunidad realizada en esta experimentación, ya que esta genera variabilidad y no siempre heredabilidad del potencial de inducción de resistencia del suelo, del cual se obtuvo el inóculo inicial. Adicionalmente, a medida que se avanza en las generaciones del inóculo, se pasan grandes poblaciones de bacterias que pueden superar la concentración de $N \sim 10^6$ e incluso de órdenes de magnitud superiores. Esto, reduce la variabilidad de la población del inóculo parental y por tanto menor biodiversidad (Sánchez et al., 2021).

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- Dietas con exceso de calcio y Hoagland 5X por un periodo de 9 días de inducción en presencia de *A. alternata*, no generan un mayor crecimiento en el sistema radicular de las plantas de brócoli bajo un sistema NFT
- La longitud de las hojas de brócoli, presenta una mayor tendencia de crecimiento al ser expuestas al hongo *A. alternata* con una dieta en base a Hoagland 5X
- No se encontraron diferencias entre las dietas con exceso de calcio y Hoagland 5X para las variables peso seco y fresco frente a la presencia de *A. alternata*
- El tratamiento con mayor contenido de sales, Hoagland 5X, mostró la menor incidencia de infección frente al ataque de *A. alternata* en las hojas, al ser expuesto a una concentración de 1×10^6 UFC/ml
- La severidad se ve reducida significativamente cuando las hojas de brócoli son expuestas a una dieta con exceso de calcio frente al patógeno *A. alternata*
- Los consorcios microbianos 3, 6 y 8 mostraron la mayor inducción de resistencia en plantas de brócoli frente al patógeno *A. alternata*

7.2 Recomendaciones

- Evaluar mayor número de dietas con diferentes niveles de calcio para buscar una mayor respuesta frente al ataque de *A. alternata* en brócoli
- Incrementar el tiempo de exposición al exceso de sales en base a Hoagland antes de realizar el proceso de inoculación con *A. alternata* para encontrar una posible mejora en la inducción de resistencia

- En el bioensayo de microbiomas incluir un tratamiento que mantenga por todo el periodo de experimentación como dieta base Hoagland 1X para determinar si la inducción de resistencia se da por medio de los consorcios microbianos o el medio de fermentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. University of Florida, Plant Pathology. Florida: Elsevier.
- Agrointegra. (2017): *Guía de Protección Integrada: Brócoli*. Gobierno de Navarra. Obtenido de: https://www.agrointegra.eu/images/pdfs/GuadeProteccionIntegrada_BRCOLI.pdf
- Arfaoui, A., El Hadrami, A., y Daayf, F. (2018). *Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by Sclerotinia sclerotiorum*. En *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 122, pp. 121-128). Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.014>
- Beltrano, J. y Gimenez, D. (2015). *Cultivo en hidroponía*. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. La Plata. Obtenido de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46752>
- Bundó, M. y Coca, M. (2017). *Calcium-dependent protein kinase OsCPK10 mediates both drought tolerance and blast disease resistance in rice plants*. En *Journal of experimental botany* (Vol. 68, pp. 2963-2975). Obtenido de: [Calcium-dependent protein kinase OsCPK10 mediates both drought tolerance and blast disease resistance in rice plants - PMC \(nih.gov\)](https://doi.org/10.1093/jxb/erw001)
- Caizatoa, R. (2016). *Determinación del periodo crítico del cultivo de brócoli (Brassica oleracea L.) Var. Avenger en competencia interespecífica*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba Ecuador. Obtenido de: [DSpace ESPOCH.: Determinación del periodo crítico del cultivo de brócoli \(Brassica oleracea L.\) Var. Avenger en competencia interespecífica](https://repositorio.espol.edu.ec/bitstream/handle/123456789/25106/1/Tesis-155%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20473.pdf)
- Conn, K., y Rosenberger, S. (2013). *Crucifer Disease Guide A practical guide for seedmen, growers and agricultural advisors*. California: Seminis. Obtenido de https://santamariaseeds.com/wp-content/uploads/2016/10/Crucifer_Disease_Guide.pdf
- Corrales, P. (2017). *Programación de riego para los híbridos domador y avenger de brócoli (Brassica oleracea var. Itálica)*. Universidad Técnica de Ambato. Obtenido de: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25106/1/Tesis-155%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20473.pdf>
- Couto, N. (2018). *Respostas fisiológicas de soja à aplicacao de caulim e carbonato de cálcio*. Universidad de São Paulo, Brazil. Obtenido de: [Natalia Couto Salib versao revisada.pdf \(usp.br\)](https://repositorio.usp.br/handle/11362/44444)
- Ding, P. y Ding, Y. (2020). *Stories of Salicylic acid: A plant defense hormone*. En *Trends in Plant Science* (Vol. 25, No.6). Elsevier BV. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Durán, T. (2013). *Análisis comparativo de la exportación de brócoli congelado para los mercados de estados unidos y la unión europea en el periodo 2008-2011*. Pontifica

Universidad Católica del Ecuador, Quito. Obtenido de:
<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/5849>

- Espinoza, K., Espinosa, E., Ramirez, D., y León, A. (2021). *Field evaluation of biological control agents and calcium-based fertilizers to control Plasmodiophora brassicae in broccoli (Brassica oleracea var. italica)*. En Journal of Biopesticides (Vol. 14, pp.83-89). Obtenido de: [Field evaluation of biopesticides against tobacco caterpillar, Spodoptera litura Fab \(jbiopest.com\)](#)
- FAOSTAT. (2021). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación*. Obtenido de: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fraire, M., Nieto, D., Cárdenas, E., Gutiérrez, G., Bujanos, R., y Vaquera, H. (2010). *Alternaria tenuissima, A. alternata y Fusarium oxysporum Hongos Causantes de la Pudrición del Florete de Brócoli*. En Revista Mexicana de Fitopatología (Vol. 28, pp.25-33). Obtenido de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092010000100003&script=sci_abstract&tlng=pt
- Forde, B., Harper, J., y Kochain, L. (2004). *Focus on Plant Nutrition*. En Plant Physiology (Vol. 136, p. 2437). Obtenido de: <https://doi.org/10.1104/pp.104.900120>
- Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B., y Burnell, G. M. (Eds.). (2019). *Aquaponics Food Production Systems*. Springer International Publishing. Obtenido de: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6>
- Guofu, Q., Yan, C., Fengrui, H., Bixia, Y., Keting, Z., Nemin, S., Bei, Z., Ruixiao, L., Wei, Z., y Yongbo, L. (2021). *Risk assessment of fungicide pesticide residues in vegetables and fruits in the mid-western region of China*. En Journal of Food Composition and Analysis (Vol. 95). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103663>
- Gutiérrez, D. (2017). Análisis de la expresión de genes de defensa VSP2, LOX2, PR1 y PDF1.2 en Arabidopsis thaliana (L) Heynh, frente a diferentes concentraciones de calcio. Universidad de las Américas, Quito, Ecuador. Obtenido de: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/7381>
- Hang, L., Yu, X., Hong-Yan, L., Huan, G., Xiao-Qin, H., Liu, Y., Ding-Tao, W., Ying-Hui, M., Hua-Bin, Li., Liang, Z., y Ren-You, G. (2022). *Nutritional values, beneficial effects, and food applications of broccoli (Brassica oleracea var. italica Plenck)*. En Trends in Food Science & Technology (Vol. 119, pp. 288-308). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.015>
- Hoagland, D., y Arnon, D. (1950). *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*. University of California, The College of Agriculture. Berkeley. Obtenido de: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=54aefd7ed4c118b6358b45db&assetKey=AS%3A273668901408776%401442259158553>
- Hopkins, W., Norman, P., y Huner, A. (2009). *Introduction to Plant Physiology*. University of Western Ontario. Ontario: John Wiley & Sons.

- Hwang, E. T., y Huh, S. U. (2022). *Development of a new hybrid calcium mineral colloid for plant growth and defense response*. En *Colloid and Interface Science Communications* (Vol. 49, p. 100628). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2022.100628>
- Jaramillo, D. (2014). *El suelo: origen, propiedades, espacialidad*. Universidad Nacional de Colombia, Escuela de Geociencias. Medellín.
- Kou, L., Yang, T., Luo, Y., Liu, X., Huang, L., y Codling, E. (2014). *Pre-harvest calcium application increases biomass and delays senescence of broccoli microgreens*. En *Postharvest Biology and Technology* (Vol. 87, pp. 70-78). Obtenido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.08.004>
- Le Strange, M. Chan, M. Daugovish, O. Natwick, E. Dara, y K. Takele, E. (2010). *Broccoli production in California*. University of California, Agriculture and Natural Resources, Davis. Obtenido de: <https://anrcatalog.ucanr.edu/Details.aspx?itemNo=7211>
- Llerena, S. (2019). *Determinación de la expresión de genes de defensa dependientes del Ácido Jasmónico, Ácido Salicílico y Etileno después de la aplicación de dietas e inhibidores de calcio en Arabidopsis thaliana*. Universidad San Francisco de Quito, Tesis para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, Quito. Obtenido de: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8527/1/144024.pdf>
- Líderes, R. (2017). *El brócoli tiene mercado que aumenta en Europa*. Revista Líderes. Obtenido de: <https://www.revistalideres.ec/lideres/brocoli-mercado-europa-produccion-economia.html>
- Microtech. (2022). *Catálogo de Productos*. Obtenido de: <https://www.microtech.bio/wp-content/uploads/2019/08/Catalogo-de-Productos-Microtech-Services-2021.pdf>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2018). *SIPA*. Obtenido de: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/legumbres-hortalizas/brocoli>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2020). *Indicadores sectoriales SIPA*. Obtenido de: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/indicador-agroeconomico>
- Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones. (2018). *Informe Sector Brocolero del Ecuador*. Quito: Dirección de Estudios Económicos y Sociales.
- Miqueloto, A., Talamini do Amarante, C., Steffens, C., Santos, A., y Mitcham, E. (2014). *Relationship between xylem functionality, calcium content and the incidence of bitter pit in apple fruit*. En *Scientia Horticulturae* (Vol. 165, pp. 319-323). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.029>
- Nolla, A., Korndorfer, G., y Coelho, L. (2006). *Efficiency of calcium silicate and carbonate in soybean disease control*. En *Journal of Plant Nutrition* (Vol. 29, pp. 2049-2061). Obtenido de: <http://doi.org/10.1080/01904160600932658>
- Oswaldo, M. (2011). *Aclimatación de 12 híbridos de Brócoli (Brassica oleracea L. Var. Itálica) en el cantón Riobamba provincia de Chimborazo*. Escuela Superior

Politécnica de Chimborazo. Obtenido de
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/677/1/13T0700%20.pdf>

- Pavón, M., Gonzáles, I., Pegels, N., Martín, R., y García, T. (2010). *PCR detection and identification of Alternaria species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1*. En *Food Control* (Vol. 21, pp. 1745-1756). Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.08.004>
- Pazmiño, C. (2021). *Evaluación de la resistencia al hongo necrótrofo Alternaria sp en brócoli (Brassica oleracea var itálica) en dos sistemas de cultivo*. Universidad San Francisco de Quito, Tesis para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, Quito.
- Ranf, S., Grimmer, J., Poschl, Y., Pecher, P., Chinchilla, D., Scheel, D., y Lee, J. (2012). *Defense-Related Calcium Signaling Mutants uncovered via a quantitative high-throughput screen in Arabidopsis thaliana*. En *Molecular Plant* (Vol. 5, pp. 115-130). Obtenido de: <https://doi.org/10.1093/mp/ssr064>
- Rolfe, S., Griffiths, J., y Ton, J. (2019). *Crying out for help with root exudates: adaptive mechanism by wich stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes*. En *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 49, pp. 73-82). Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.003>
- Rout, M. (2014). *The Plant Microbiome*. En *Genomes of Herbaceous Land Plants* (pp. 279-309). Elsevier. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417163-3.00011-1>
- Sánchez, A., Vila, J., Chang, C., Díaz-Colunga, J., Estrela, S., y Gomez, M. (2021). *Directed Evolution of Microbial Communities*. En *Annual Review of Biophysics* (Vol. 50, pp. 323-341). Obtenido de: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-101220-072829>
- Sánchez, V. (2017). *Aislamiento e identificación de bacterias con potencial de biocontrol a Alternaria sp., acoiacas a Solanum lycopersicum*. Universidad Nacional de Colombia, Tesis para la obtención del título de Magíster en Ciencias Agrarias, Bogotá.
- Sayma, N., Hossain, F., Mahmud, N., Hassan, O., Islam, T., y Akanda, A. (2022). *Alternaria leaf spot of broccoli caused by Alternaria alternata in Bangladesh*. En *Plant Protection Science* (Vol. 58, pp. 49-56). Obtenido de: <https://doi.org/10.17221/44/2020-PPS>
- Siciliano, I., Ortega, S., Gilardi, G., Bosio, P., Garibaldi, A., y Gullino, M. (2018). *Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic Alternaria species isolated from basil*. En *Food Microbiology* (Vol. 73, pp. 264-274). Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.001>
- Siciliano, I., Gilardi, G., Ortu, G., Gisi, U., Gullino, M., y Garibaldi, A. *Identification and characterization of Alternaria species causing leaf spot on cabbage, cauliflower, wild and cultivated rocket by using molecular and morphological features and mycotoxin production*. En *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 149, pp. 401-413). Obtenido de: <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1190-0>

- Soma, S., Amatulli, M., Masiello, M., Moretti, A., y Logrieco, A. (2019). *Alternaria species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach*. En International Journal of Food Microbiology. (Vo. 293, pp. 34-43). Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.001>
- Son, J., Kim, H., y Ahn, T. (2020). *Hydroponic systems*. En Plant Factory (pp. 273-283). Elsevier. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00020-0>
- Sun, X., Pan, B., Wang, Y., Xu, W., y Zhang, S. (2020). *Exogenous Calcium Improved Resistance to Botryosphaeria dothidea by Increasing Autophagy Activity and Salicylic Acid Level in Pear*. En Molecular Plant-Microbe Interactions® (Vol. 33, Issue 9, pp. 1150–1160). Scientific Societies. <https://doi.org/10.1094/mpmi-04-20-0101-r>
- Tropicos. (2022). *Tropicos.org*. Obtenido de Missouri Botanical Garden: <https://www.tropicos.org/name/4102963>
- Vélez, D., y Álava, M. (2021). *Análisis de los canales de comercialización del brócoli en Ecuador*. En Revista Tecnológica-ESPOL (Vol.33, pp. 181-201). <https://doi.org/10.37815/rte.v33n3.857>
- Wang, J., Liu, X., Zhang, A., Ren, Y., Wu, F., Wang, G., Xu, Y., Lei, C., Zhu, S., Pan, T., Wang, Y., Zhang, H., Wang, F., Tan, Y.-Q., Wang, Y., Jin, X., Luo, S., Zhou, C., Zhang, X., y Wan, J. (2019). *A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice*. En Cell Research (Vol. 29, Issue 10, pp. 820–831). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0219-7>
- Wang, B., Lou, T., Wei, L., Chen, W., Huang, L., Ding, L., Zhao, W., Zhang, P., Sun, P., y Wang, K. (2021). Biochemical and molecular characterization of *Alternaria alternata* isolates highly resistant to procymidone from broccoli and cabbage. En Phytopathology Research (Vol. 3 (1)). <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00092-z>
- Winkler, A., Hurtado, G., y Knoche, M. (2021). *Xylem, phloem and transpiration flows in developing strawberries*. En Scientia Horticulturae (Vol 288). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110305>
- Yuan, L., Jian, W., Xuran, Z., Yang, L., Ming, C., Weihai, X., Yuping, W., Na, L., Liting, Y., y Pengfei, S. (2021). Effects of electrolyzed water treatment on pesticide removal and texture quality in fresh-cut cabbage, broccoli, and color pepper. En Food Chemistry (Vol 353). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129408>
- Zhang, W., Jiang, L., Huang, J., Ding, Y., y Liu, Z. (2020). *Loss of proton/calcium exchange 1 results in the activation of plant defense and accelerated senescence in Arabidopsis*. En Plant Science (Vol 296). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110472>

X. ANEXOS

ANEXO A: Medio Nutritivo Hoagland

SOLUTION 1		cc in a liter of nutrient solution
<i>M</i> KH ₂ PO ₄ , potassium acid phosphate		
		1
<i>M</i> KNO ₃ , potassium nitrate		
		5
<i>M</i> Ca(NO ₃) ₂ , calcium nitrate ...		
		5
<i>M</i> MgSO ₄ , magnesium sulfate...		
		2
SOLUTION 2		cc in a liter of nutrient solution
<i>M</i> NH ₄ H ₂ PO ₄ , ammonium acid phosphate		
		1
<i>M</i> KNO ₃ , potassium nitrate		
		6
<i>M</i> Ca(NO ₃) ₂ , calcium nitrate ...		
		4
<i>M</i> MgSO ₄ , magnesium sulfate...		
		2
Compound	Grams dissolved in 1 liter of H ₂ O	
H ₃ BO ₃ , boric acid.....	2.86	
MnCl ₂ · 4H ₂ O, manganese chloride	1.81	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O, zinc sulfate.....	0.22	
CuSO ₄ · 5H ₂ O, copper sulfate..	0.08	
H ₂ MoO ₄ · H ₂ O, molybdic acid (assaying 85 per cent MoO ₃)	0.02	

Fuente: (Hoagland y Arnon, 1950).

ANEXO B: Dieta óptima Hoagland

Dieta óptima	Elementos	Concentración de las soluciones madres (gr/L)	Para preparar la solución	Solución 1 L
Macros	(2M) KNO ₃	202	2.5	0.505
	(2M) Ca(NO ₃) x 4H ₂ O	236	2.5	1.18
	Hierro quelatado C ₁₀ H ₁₃ FeN ₂ O ₈	15	1	0.015
	(2M) MgSO ₄ x 7H ₂ O	493	1	0.493
	(1M) NH ₄ NO ₃	80	1	0.08
	(1M) KHPO ₄ (pH a 6 con 1M K(OH))	136	0.5	0.136
Micros	H ₃ BO ₃	2.86	0.5	0.00143
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1.81		0.000905
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.22		0.00011
	CuSO ₄	0.051		0.0000255
	H ₃ MoO ₄ x H ₂ O	0.09		0.000045
	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	0.12		0.00006

Fuente: (Gutiérrez, 2017).

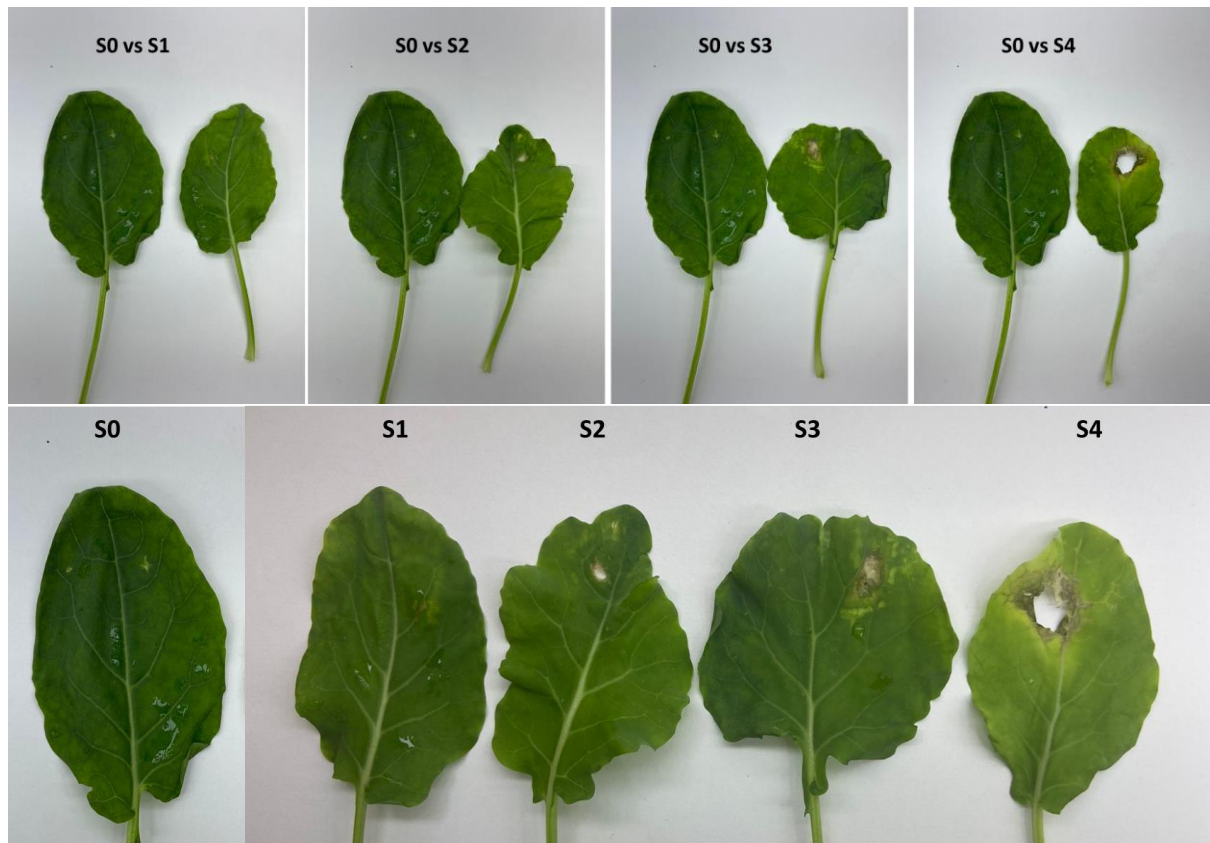
ANEXO C: Dieta con exceso de calcio 5x Hoagland

Dieta óptima	Elementos	Concentración de las soluciones madres (gr/L)	Para preparar la solución	Solución 1 L
Macros	(2M) KNO ₃	202	2.5	0.505
	(2M) Ca(NO ₃) x 4H ₂ O	236	2.5	1.18
	Hierro quelatado C ₁₀ H ₁₃ FeN ₂ O ₈	15	1	0.015
	(2M) MgSO ₄ x 7H ₂ O	493	1	0.493
	(1M) NH ₄ NO ₃	90	1	0.08
	Ca (OH) ₂ 50 ml Stock	50	15	1.5
	(1M) KHPO ₄ (pH a 6 con 1M K(OH))	136	0.5	0.136
Micros	H ₃ BO ₃	2.86	0.5	0.00143
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1.81		0.000905
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.22		0.00011
	CuSO ₄	0.051		0.0000255
	H ₃ MoO ₄ x H ₂ O	0.09		0.000045
	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	0.12		0.00006

Fuente: (Gutiérrez, 2017).

ANEXO D: Dieta con exceso de sales Hoagland 5X

Dieta óptima	Elementos	Concentración de las soluciones madres (gr/L)	Para preparar la solución	Solución 1 L
Macros	(2M) KNO ₃	202	12.5	2.525
	(2M) Ca(NO ₃) x 4H ₂ O	236	12.5	5.9
	Hierro quelatado C ₁₀ H ₁₃ FeN ₂ O ₈	15	5	0.075
	(2M) MgSO ₄ x 7H ₂ O	493	5	2.465
	(1M) NH ₄ NO ₃	80	5	0.4
	(1M) KHPO ₄ (pH a 6 con 1M K(OH))	136	2.5	0.68
Micros	H ₃ BO ₃	2.86	2.5	0.00715
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1.81		0.004525
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.22		0.00055
	CuSO ₄	0.051		0.0001275
	H ₃ MoO ₄ x H ₂ O	0.09		0.000225
	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	0.12		0.0003

ANEXO E: Escala de Severidad *Alternaria alternata*

ANEXO F: Brumik


Descripción

Es una mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos

Composición

ácido húmico 59.55%, ácido fúlvico 15.88%, potasio 16%, materia orgánica total 63.27%.

Función

- Mejora la composición del suelo.
- Estimula el crecimiento microbiano.
- Estabiliza pH.
- Aumenta desarrollo radicular.
- Aumenta el intercambio y retención de nutrientes
- Mejora la absorción de nutrientes.
- Aumenta la tolerancia a stress.
- Mejora la germinación de semillas.

Dosis

2-8 kg/ha

Certificación

Agrocalidad: 1390-F-AGR



Fuente: (Microtech, 2022).

ANEXO G: Análisis estadístico de peso fresco híbrido Domador

TRANS RAÍZ PESO

ANOVA de un solo factor: Testigo -P; Testigo +P; Calcio +P; Calcio -P; Hoagland 5x -P; Hoagland 5x +P

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 Testigo -P; Testigo +P; Calcio +P; Calcio -P; Hoagland 5x -P; Hoagland 5x +P

Análisis de Varianza

Fuente GL SC Ajust. MC Ajust. Valor F Valor p

Factor	5	0,07442	0,01488	0,05	0,998
Error	24	7,48776	0,31199		
Total	29	7,56218			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.	
	S R-cuad. (ajustado)	(pred)	
	0,558561	0,98%	0,00% 0,00%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Testigo -P	5	2,023	0,508	(1,508; 2,539)
Testigo +P	5	1,920	0,580	(1,405; 2,436)
Calcio +P	5	2,062	0,580	(1,546; 2,577)
Calcio -P	5	2,067	0,604	(1,551; 2,582)
Hoagland 5x -P	5	2,007	0,505	(1,491; 2,522)
Hoagland 5x +P	5	2,049	0,567	(1,533; 2,564)

Desv.Est. agrupada = 0,558561

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Calcio -P	5	2,067	A
Calcio +P	5	2,062	A
Hoagland 5x +P	5	2,049	A
Testigo -P	5	2,023	A
Hoagland 5x -P	5	2,007	A
Testigo +P	5	1,920	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO H: Análisis estadístico chi-cuadrado por asociación severidad híbrido Domador

Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X
Informe de resumen

¿Difieren los perfiles porcentuales?

Las diferencias entre los perfiles de resultados porcentuales son significativas ($p < 0,05$). Usted puede concluir que existe una asociación entre Resultado y X.

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que existen diferencias entre los perfiles porcentuales de resultados en el nivel de significancia de 0,05.
- Gráfica de perfiles porcentuales: Utilícese para comparar el perfil de cada valor de X y el perfil promedio.
- % Gráfica de diferencias: Busque barras largas para identificar resultados con la mayor diferencia porcentual entre los conteos observados y esperados.

Gráf. de perfiles porcentuales
Compare los perfiles.

Categoría	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Resultado 4	Resultado 5
Promedio	40%	35%	16%	4%	4%
Testigo +P	36%	39%	15%	1%	9%
Calcio +P	36%	33%	27%	3%	1%
Hoagland 5x	49%	33%	6%	9%	3%

Diferencia % entre conteo observados y esperados

Positivo: Ocurre con más frecuencia de lo esperado
Negativo: Ocurre con menos frecuencia de lo esperado

Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X
Informe de diagnóstico

Conteos observados y esperados

	Testigo +P		Calcio +P		Hoagland 5x	
	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp
Resultado 1	36	40	36	40	49	40
Resultado 2	39	35	33	35	33	35
Resultado 3	15	16	27	16	6	16
Resultado 4	1	4,3	3	4,3	9	4,3
Resultado 5	9	4,3	1	4,3	3	4,3
Total	100	100	100	100	100	100

Los conteos esperados deben ser por lo menos 2 para asegurar la validez del valor p de la prueba.

Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X
Tarjeta de informe

ANEXO I: Análisis estadístico chi-cuadrado por asociación severidad híbrido Coronado

Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X

Informe de resumen

¿Difieren los perfiles porcentuales?

Las diferencias entre los perfiles de resultados porcentuales son significativas ($p < 0,05$). Usted puede concluir que existe una asociación entre Resultado y X.

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que existen diferencias entre los perfiles porcentuales de resultados en el nivel de significancia de 0,05.
- Gráfica de perfiles porcentuales: Utilícese para comparar el perfil de cada valor de X y el perfil promedio.
- % Gráfica de diferencias: Busque barras largas para identificar resultados con la mayor diferencia porcentual entre los conteos observados y esperados.

Gráf. de perfiles porcentuales
Compare los perfiles.

Diferencia % entre conteo observados y esperados

Positivo: Ocurre con más frecuencia de lo esperado
Negativo: Ocurre con menos frecuencia de lo esperado

Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X

Informe de diagnóstico

Conteos observados y esperados

	Testigo +P		X1		X2		X3		X4		X5	
	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp
Resultado 1	61	76	82	76	71	76	100	76	56	76	83	76
Resultado 2	31	19	15	19	30	19	1	19	20	19	15	19
Resultado 3	6	6,7	5	6,7	1	6,7	1	6,7	23	6,7	4	6,7
Resultado 4	5	2,2	1	2,2	1	2,2	1	2,2	4	2,2	1	2,2
Resultado 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	104		104		104		104		104		104	

Los conteos esperados deben ser por lo menos 1 para asegurar la validez del valor p de la prueba.

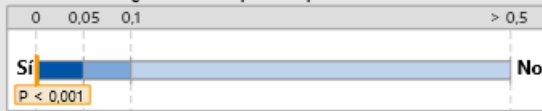
Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X

Tarjeta de informe

Verificar	Estado	Descripción
Validez de la prueba		Todas las muestras son lo suficientemente grandes para obtener suficientes conteos esperados. El valor p de la prueba debería ser exacto.

Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X Informe de resumen

¿Difieren los perfiles porcentuales?

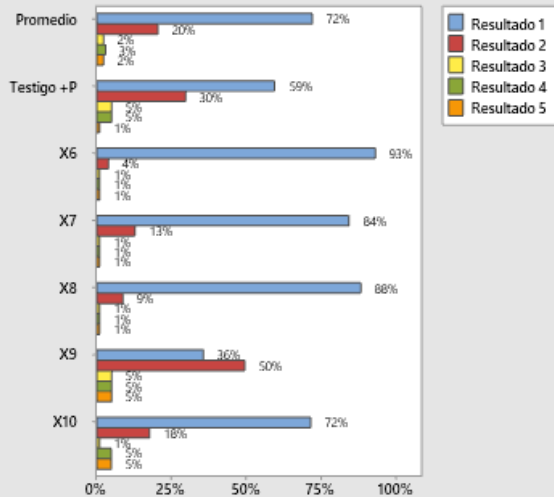


Las diferencias entre los perfiles de resultados porcentuales son significativas ($p < 0,05$). Usted puede concluir que existe una asociación entre Resultado y X.

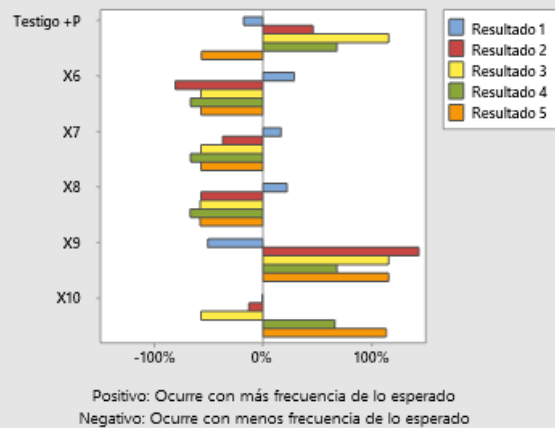
Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que existen diferencias entre los perfiles porcentuales de resultados en el nivel de significancia de 0,05.
- Gráfica de perfiles porcentuales: Utilícese para comparar el perfil de cada valor de X y el perfil promedio.
- % Gráfica de diferencias: Busque barras largas para identificar resultados con la mayor diferencia porcentual entre los conteos observados y esperados.

Gráf. de perfiles porcentuales
Compare los perfiles.



Diferencia % entre conteo observados y esperados



Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X Informe de diagnóstico

Conteos observados y esperados

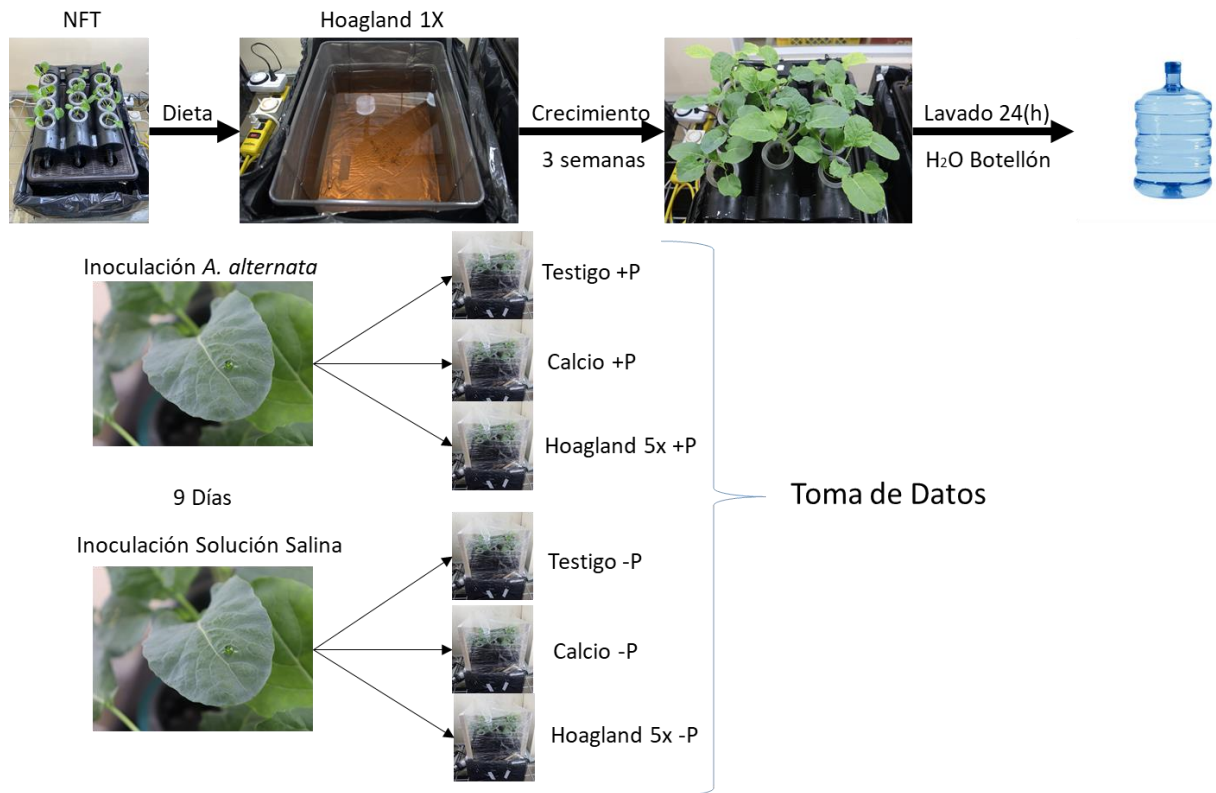
	Testigo +P		X6		X7		X8		X9		X10	
	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp	Obs	Exp
Resultado 1	60	73	95	74	86	74	91	74	36	73	73	74
Resultado 2	30	20	4	21	13	21	9	21	50	20	18	21
Resultado 3	5	2,3	1	2,3	1	2,3	1	2,4	5	2,3	1	2,3
Resultado 4	5	3,0	1	3,0	1	3,0	1	3,0	5	3,0	5	3,0
Resultado 5	1	2,3	1	2,3	1	2,3	1	2,4	5	2,3	5	2,3
Total	101		102		102		103		101		102	

Los conteos esperados deben ser por lo menos 2 para asegurar la validez del valor p de la prueba.

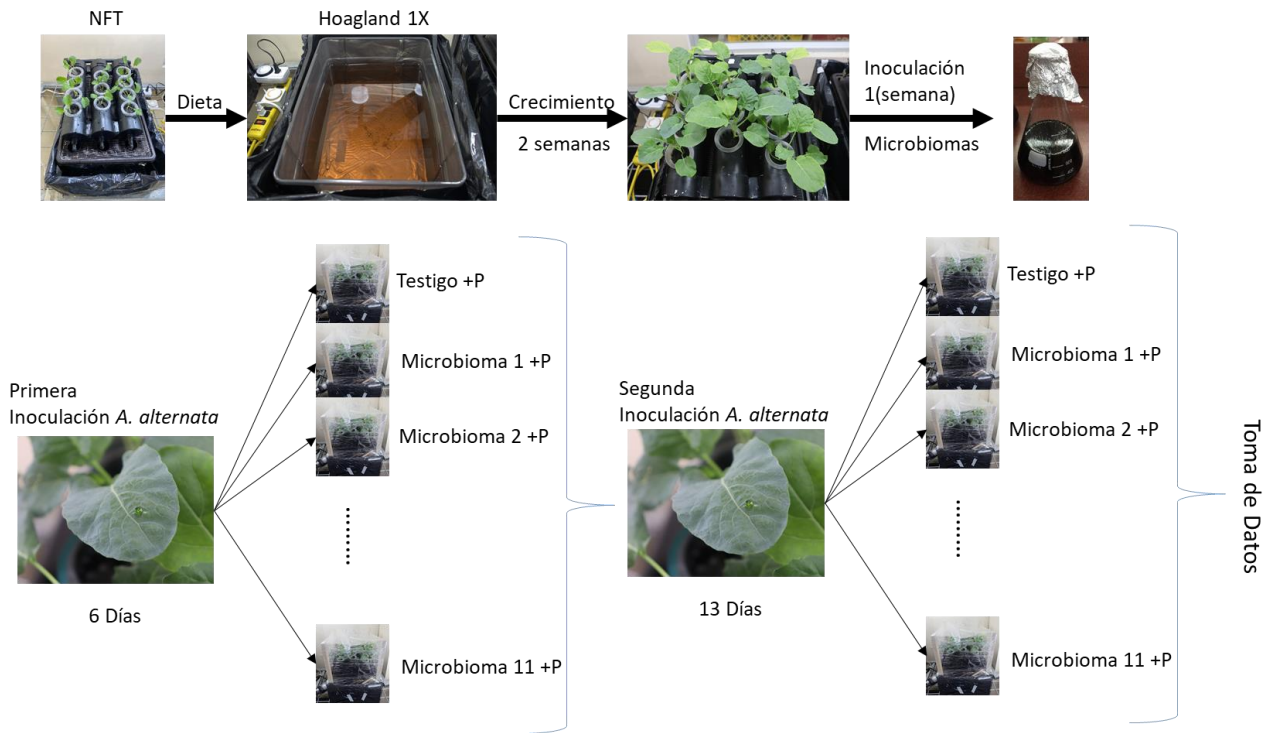
Prueba chi-cuadrada para asociación: Resultado por X Tarjeta de informe

Verificar	Estado	Descripción
Validez de la prueba		Todas las muestras son lo suficientemente grandes para obtener suficientes conteos esperados. El valor p de la prueba debería ser exacto.

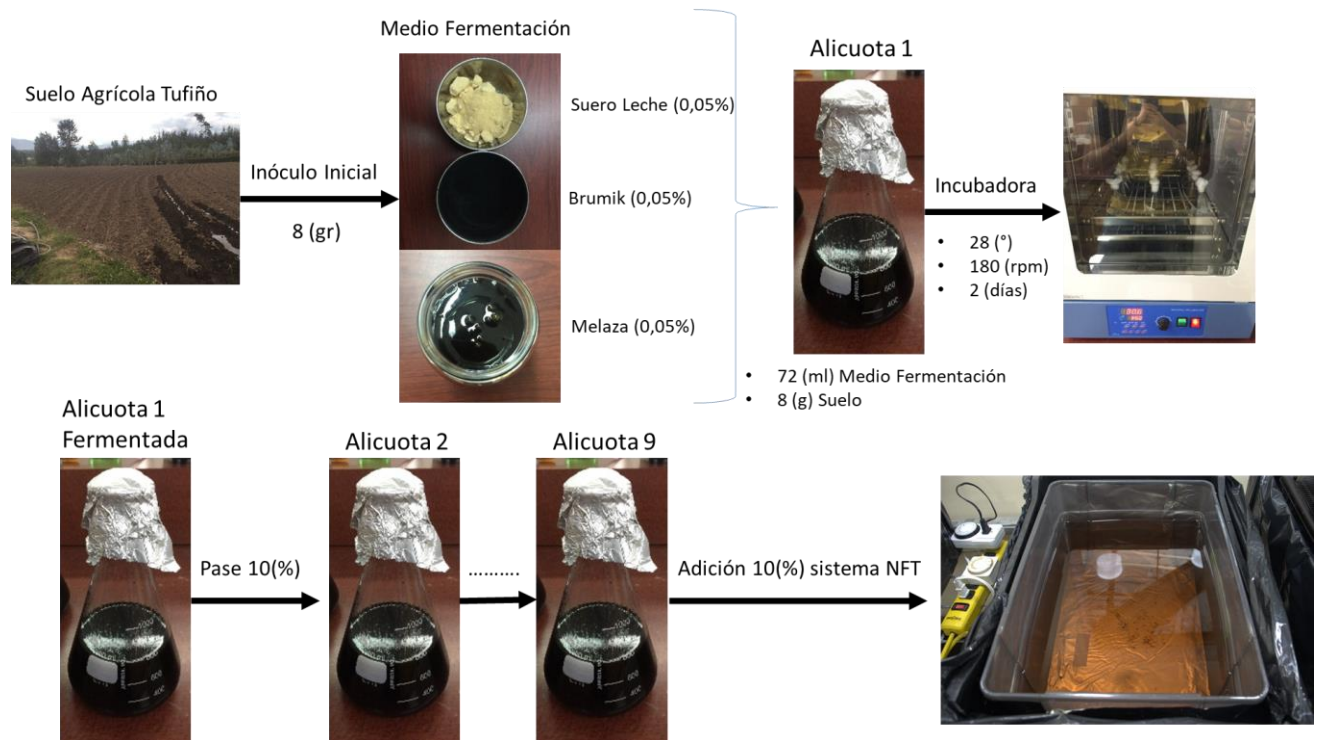
ANEXO J: Metodología Bioensayo Calcio



ANEXO K: Metodología Bioensayo Microbiomas



ANEXO L: Consorcios microbianos



ANEXO M: Sistema Hidropónico tipo NFT

ANEXO N: Newponia A & newponia B Crecimiento



Descripción

Bioestimulante ultrasoluble que puede ser utilizado en jardinería y cultivos hidropónicos.

Composición

Nitrógeno (N): 6.14 %, Potasio (K₂O): 8.47%,
 Calcio (CaO): 4.73%, Hierro (Fe): 0.11%,
 Magnesio (MgO): 2.55%, Molibdeno (Mo): 0.01%,
 Boro (B): 0.01%, Cobre (Cu): 0.007%,
 Manganeso: 0.5 ppm, Azufre: 64 ppm,
 Fósforo: 31 ppm, Zinc: 0.05 ppm

Función - Crecimiento

Presenta dos soluciones de macronutrientes (A) y micronutrientes (B) que permite su absorción radicular de manera eficiente. Su composición permite crecimiento de hojas y raíces, brinda resistencia y vigor fortaleciendo tallos y raíces, mejora rendimiento y calidad sobre frutos, follaje y verduras.

Dosis

Diluir 2.5 mL de la solución A, disolver bien y luego colocar 2.5 mL de la solución B en 1 L de agua a ser aplicado.

Certificación

Agrocalidad: 741-F-AGR-P



Fuente: (Microtech, 2022).