

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Aislamiento e identificación de fitopatógenos del tomate
Solanum lycopersicum cv. Pietro**

Jael Alejandra Flores Márquez

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 12 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales****HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Aislamiento e identificación de fitopatógenos del tomate
Solanum lycopersicum cv. Pietro**

Jael Alejandra Flores Márquez

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Quito, 12 de mayo de 2025

© 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: Jael Alejandra Flores Márquez

Código: 00324435

Cédula de identidad: 1721169488

Lugar y fecha: Quito, 12 de mayo de 2025

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos hortícolas de mayor relevancia económica a nivel mundial y en Ecuador, debido a su valor nutricional y su alta demanda en el mercado local e internacional. No obstante, una de las principales amenazas para su producción son las enfermedades provocadas por fitopatógenos, especialmente hongos y oomicetos. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo aislar, evaluar e identificar hongos y oomicetos responsables de lesiones necróticas en tallos de tomate cv. Pietro en cultivos de la provincia de Cotopaxi. Para ello, se recolectaron plantas enfermas de fincas de Salcedo ($1^{\circ}03'17.9''S$, $78^{\circ}34'43.2''W$) y se realizaron aislamientos hasta obtener cultivos puros. Se obtuvieron 16 aislados, los cuales fueron caracterizados microscópicamente y se determinó que pertenecían a los géneros: 9 *Clonostachys* spp., 2 *Fusarium* spp., 2 *Pythium* spp. y 3 *Alternaria* spp. Las pruebas de patogenicidad se realizaron con todos los aislados y únicamente los de *Alternaria* aislados A1 y A2 provocaron sintomatología similar a lo observado en campo. La sintomatología se caracterizó por presentar lesiones necróticas en los tallos y manchas de color café a negro con halos amarillentos en las hojas. Para identificar a los patógenos se realizó amplificación y secuenciación de las regiones ITS, *tef-1α* y *rpb2*, y la construcción de un árbol filogenético por inferencia bayesiana y el modelo GTR. Los dos aislados fueron identificados como *Alternaria arborescens*, posicionándose en el clado correspondiente con un posterior de 0.99. Este hallazgo representa un primer registro de *Alternaria arborescens* afectando cultivos de tomate en Ecuador, lo que resalta la necesidad de implementar estrategias de manejo específicas para este patógeno. Los resultados respaldan el desarrollo de programas de monitoreo y control para mantener la sanidad y productividad del cultivo en el país.

Palabras clave: *Alternaria arborescens*, *Solanum lycopersicum*, Ecuador, árbol filogenético, pruebas de patogenicidad.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most economically important horticultural crops worldwide and in Ecuador, due to its nutritional value and high demand in both local and international markets. However, one of the main threats to its production is the occurrence of diseases caused by phytopathogens, particularly fungi and oomycetes. In this context, the present study aimed to isolate, evaluate, and identify fungi and oomycetes responsible for necrotic lesions on the stems of tomato cv. Pietro in crops from the Cotopaxi province. Diseased plants were collected from farms in Salcedo (1°03'17.9"S, 78°34'43.2"W), and isolations were performed until pure cultures were obtained. A total of 16 isolates were obtained and microscopically characterized, revealing they belonged to the following genera: 9 *Clonostachys* spp., 2 *Fusarium* spp., 2 *Pythium* spp., and 3 *Alternaria* spp. Pathogenicity tests were conducted with all the isolates, and only the *Alternaria* isolates A1 and A2 produced symptoms similar to those observed in the field. The symptomatology was characterized by necrotic lesions on the stems and brown to black leaf spots with yellow halos. To identify the pathogens, amplification and sequencing of the ITS, *tef-1α*, and *rpb2* regions were performed, followed by the construction of a phylogenetic tree using Bayesian inference and the GTR model. The two isolates were identified as *Alternaria arborescens*, clustering in the corresponding clade with a posterior probability of 0.99. This finding represents the first report of *Alternaria arborescens* affecting tomato crops in Ecuador, highlighting the need to implement specific management strategies for this pathogen. The results support the development of monitoring and control programs to maintain crop health and productivity in the country.

Keywords: *Alternaria arborescens*, *Solanum lycopersicum*, Ecuador, phylogenetic tree, pathogenicity tests.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	11
2. Métodos.....	15
2.1 Muestreo.....	15
2.2 Aislamiento de hongos y oomicetos.....	15
2.3 Pruebas de patogenicidad.....	16
2.4 Identificación de los aislados usando herramientas de ADN	16
2.5 Construcción de árboles filogenéticos.....	17
3. Resultados.....	18
3.1 Aislamiento y caracterización de los aislados obtenidos.....	18
3.2 Pruebas de patogenicidad en plantas sanas de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Pietro.....	18
3.3 Identificación de las regiones de ADN.....	19
3.4 Análisis filogenético.....	19
4. Discusión.....	20
5. Conclusiones.....	24
6. Tablas.....	25
7. Figuras.....	28
8. Referencias bibliográficas.....	33
9. Anexos.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización macro y microscópica de los 16 microorganismos aislados obtenidos de plantas enfermas de <i>Solanum lycopersicum</i>	25
Tabla 2. Condiciones de las PCRs con los primers utilizados para amplificar las regiones ITS, <i>rpb2</i> y <i>tef-1α</i> de <i>Alternaria arborescens</i>	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de las pruebas de patogenicidad en hojas y tallos con el aislado A1.....	28
Figura 2. Resultados de las pruebas de patogenicidad en hojas y tallos con el aislado A2.....	29
Figura 3. Resultados combinados con <i>Alternaria arborescens</i> aislado A1, sintomatología observada en el campo, ensayos de patogenicidad e identificación macro y microscópica	30
Figura 4. Resultados combinados con <i>Alternaria arborescens</i> aislado A2, sintomatología observada en el campo, ensayos de patogenicidad e identificación macro y microscópica	31
Figura 5. Árbol filogenético del aislado A1 y A2 utilizando los marcadores ITS, <i>tef-1α</i> y <i>rpb2</i>	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición nutricional de los medios PDA, V8 y Dox-Czapek empleados en el cultivo de hongos y oomicetos.....	37
Anexo 2. Composición de la solución Hoagland como medio nutritivo para el desarrollo de plantas.....	38

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea de la familia *Solanaceae*, ampliamente cultivada y consumida a nivel mundial. Se caracteriza por poseer un tallo grueso y verde, que puede alcanzar hasta 2,5 metros de longitud. Sus frutos inicialmente verdes, cambian de color a rojo al madurar, aunque algunas variedades presentan colores como amarillo, rosado y naranja (Magallanes, 2022). El tomate es originario de América del Sur, es un alimento fundamental en la dieta global gracias a su sabor, versatilidad y alto valor nutricional. Además, esta fruta es una fuente importante de compuestos como el licopeno, β-caroteno, flavonoides y vitamina C, los cuales le confieren propiedades antioxidantes y potenciales beneficios para la salud humana (Cruz et al., 2013).

En Ecuador, el cultivo del tomate tiene una gran importancia tanto económica como alimentaria, ya que forma parte de la canasta básica y cuenta con una alta demanda en el mercado nacional. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC, 2023), en el país se registran 1.417 hectáreas sembradas de tomate riñón, con una producción total de aproximadamente 40.000 toneladas métricas. El consumo per cápita se estima en alrededor de 5 kilogramos por año.

Las principales zonas productoras de tomate en Ecuador incluyen provincias como Cotopaxi (32,27%), Imbabura (22,48%), Chimborazo (20,79%), Tungurahua (12,84%) y Pichincha (5,41%) (INEC, 2023). En la Sierra, el cultivo se desarrolla principalmente en invernaderos para garantizar condiciones óptimas de temperatura. La producción de tomate se da en climas cálidos-templados, con temperaturas entre 23 y 26 °C y una humedad relativa del 50-60 % (Ortega et al., 2022). En el país se siembran diversos cultivares de tomate, cada uno adaptado a diferentes condiciones agroclimáticas y demandas del mercado. Entre las más populares se

encuentran Fortuna, Sheila, Charleston, Titán, Pietro, Fortaleza, Cherry y Chonto (El Comercio, 2011).

Entre los cultivares más utilizados en Ecuador se encuentra Pietro, un tomate de larga vida, alto rendimiento y gran adaptabilidad tanto a campo abierto como a invernadero. Produce frutos grandes y firmes (230–250 g) y buena cobertura foliar. Además, presenta tolerancia a patógenos clave como Tomato Mosaic Virus (ToMV), *Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium* spp. y nemátodos (ImporAlaska, 2019).

El cultivo del tomate enfrenta diversas amenazas bióticas que comprometen su salud y rendimiento. Entre los principales agentes fitopatógenos se encuentran bacterias, virus, nemátodos, insectos, hongos y oomicetos. Entre estos, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. tienen en común la capacidad de provocar enfermedades con sintomatologías similares que afectan principalmente al tallo del tomate, generando lesiones necróticas que interfieren con el transporte de agua y nutrientes dentro de la planta (Blancard, 2013). Esta afectación provoca una disminución en el crecimiento vegetativo, reduce la calidad del fruto y, en casos graves, puede llevar a la muerte de la planta, lo que causa pérdidas que oscilan entre el 70% y el 80% (Panno et al., 2021). Estas lesiones necróticas en los tallos se han observado con frecuencia en cultivos de tomate en Ecuador, particularmente asociadas a infecciones por *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, según reportes de diagnóstico fitopatológico (Zamora, 2023; Espinoza, 2009).

Botrytis cinerea, causante del moho gris, es un hongo oportunista que prospera en ambientes húmedos y fríos. Se desarrolla en tejidos senescentes y heridas, formando lesiones marrones húmedas que, con el tiempo, se cubren con un moho grisáceo característico. Esta enfermedad

afecta hojas, tallos y frutos, favoreciendo su descomposición y reduciendo la calidad del cultivo (Gómez et al., 2022).

Los hongos del género *Alternaria*, como *A. arborescens* y *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, causan la enfermedad conocida como mancha negra. Se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas con patrones concéntricos en tallos, pecíolos y frutos. En infecciones severas, estas lesiones pueden rodear completamente el tallo, interfiriendo con el flujo de agua y nutrientes, lo que provoca marchitez y muerte de la planta (Gómez et al., 2022).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* es el agente causal de la marchitez vascular, una enfermedad que afecta los vasos conductores del tomate. Este hongo ingresa por las raíces y coloniza el xilema, provocando obstrucción en el transporte de agua y nutrientes. Sus síntomas incluyen marchitez, amarillamiento foliar y necrosis vascular, que pueden llevar a la muerte de la planta (Ascencio et al., 2008).

Entre los patógenos del suelo, *Pythium* spp. es responsable del damping-off, una enfermedad que afecta plántulas en su etapa inicial. Este oomiceto ataca la base del tallo y las raíces, provocando pudrición y colapso de la plántula. En plantas adultas, puede generar pudrición radicular y reducción del vigor, especialmente en suelos húmedos y mal drenados (Blancard, 2013).

Finalmente, *Phytophthora* spp. es un grupo de patógenos que afectan tanto las raíces como la parte aérea del tomate. Su infección genera necrosis radicular, pudrición del tallo y lesiones en frutos en contacto con el suelo. Entre las especies más comunes se encuentra *Phytophthora nicotianae*, que causa pudrición en raíces y base del tallo, y *Phytophthora infestans*, responsable del tizón tardío (Blancard, 2013).

En Ecuador, el manejo de enfermedades en el cultivo de tomate incluye principalmente estrategias como: el uso de fungicidas químicos, la rotación de cultivos, prácticas de manejo

integrado (MIPE) y, cada vez más, el uso de bioinsumos como extractos vegetales y biofungicidas (Arroyo et al., 2020).

Identificar los organismos involucrados de enfermedades en los cultivos es fundamental para desarrollar estrategias de control más específicas y efectivas. Conocer con precisión que patógeno está involucrado permite implementar medidas de control dirigidas, lo cual es clave para reducir pérdidas económicas y proteger los cultivos. La caracterización de los patógenos fúngicos a base de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) se utiliza comúnmente, ya que presenta una alta variabilidad entre especies, lo que la convierte en un marcador molecular confiable para propósitos taxonómicos. No obstante, en muchos casos esta región no es suficiente para una identificación precisa, por lo que se recomienda complementar con el secuenciamiento de otras regiones de ADN, cuya selección dependerá del género o especie de interés (Pryor & Gilbertson, 2000). A partir de estas secuencias, es posible construir árboles filogenéticos, que sirven para entender como se relacionan evolutivamente las especies, clasificarlas correctamente e incluso detectar nuevas especies (Kapli et al., 2020).

MÉTODOS

2.1 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en invernaderos de fincas ubicadas en Salcedo ($1^{\circ}03'17.9''S$, $78^{\circ}34'43.2''W$), provincia de Cotopaxi, Ecuador. Se recolectaron seis plantas completas de tomate que presentaban síntomas visibles de enfermedad, como manchas marrones o negras, y marchitamiento foliar. Durante la inspección en un invernadero de *Solanum lycopersicum* cv. Pietro, se observó una incidencia del 100 %, lo que indica que la totalidad de las plantas presentaban síntomas visibles de enfermedad. En el momento del muestreo, el agente causal de esta sintomatología era desconocido. Estas plantas fueron utilizadas para el aislamiento de fitopatógenos. Cada muestra se colocó de manera independiente en bolsas plásticas, se etiquetaron y transportaron al Laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad San Francisco de Quito para su procesamiento. La recolección de muestras se realizó en el marco del contrato MAAE-DBI-CM-2022-0223, correspondiente al proyecto “Estudio genético del microbioma presente en cultivos en el Ecuador continental”, autorizado por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE).

2.2 Aislamiento de hongos y oomicetos

Se utilizaron muestras de tallo de tomate, cultivar Pietro. Estas fueron lavadas con agua corriente para eliminar residuos de suelo y luego cortadas en fragmentos de 5 cm de longitud. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, se desinfectaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5% durante un minuto y 30 segundos, seguidos de enjuagues con agua destilada estéril y etanol (C_2H_6O) al 70% durante 1 minuto, con dos enjuagues adicionales en agua destilada estéril. Los fragmentos de tallo con sintomatología fueron cortados en trozos de $\sim 5\text{ mm}^2$ y sembrados en tres medios de cultivo: Papa Dextrosa Agar

(PDA), medio V8 y Agar Dox-Czapek, todos suplementados con gentamicina (160 mg/L) (Anexo 1). Las muestras fueron incubadas a 28 °C durante siete días, con evaluaciones diarias de crecimiento y morfología (Muñoz et al., 2020). Se observaron 16 morfologías fúngicas distintas, las cuales fueron aisladas en cultivos puros utilizando el método de aislamiento por punto de hifa (Castillo et al., 2001). Finalmente, se realizó la identificación macroscópica de los hongos mediante la observación de características morfológicas distintivas, y la identificación microscópica se llevó a cabo utilizando un aumento total de 400x en el microscopio óptico (Tabla 1).

2.3 Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron plantas sanas de *Solanum lycopersicum* cv. Pietro, de 4 semanas de edad. Las cuales fueron trasplantadas en macetas de 1 litro con un sustrato compuesto de turba y perlita en proporción 1:1, previamente esterilizado por autoclave (121 °C, 1 atm, 1 h). Se usaron cinco plantas por cada tratamiento. Para los aislados (A1 y A2), correspondientes a *Alternaria* spp. se utilizaron cajas con micelio de 15 días de crecimiento en medio (PDA+G). La inoculación se realizó mediante aspersión de 10 ml de una suspensión (1×10^7 conidios/ml) en cada planta. Como control, se utilizaron plantas tratadas con agua destilada estéril bajo las mismas condiciones de acuerdo al protocolo descrito por Ramirez et al., 2023. Las plantas fueron colocadas en una cámara húmeda con temperaturas que oscilaban entre 18 y 29 °C (noche/día), con un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. El riego se realizó semanalmente con solución nutritiva de Hoagland (Htun et al., 2020) (Anexo 2). La sintomatología relacionada con la enfermedad fue registrada al día 30 post-inoculación, y se efectuó el re-aislamiento de los hongos para confirmar el cumplimiento de los postulados de Koch. Todos los demás aislados se inocularon en plantas sanas; con las metodologías descritas para *Fusarium* (Liu et al., 2023), y *Phytophthora* (De Genring & Poleatewich, 2023)

2.4 Identificación de los aislados usando herramientas de ADN

De los aislados fúngicos A1 y A2, que resultaron positivos en las pruebas de patogenicidad, se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen). La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, mientras que su concentración y pureza se evaluaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop. Posteriormente, se amplificaron tres regiones génicas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los primers ITS1-4 para la región del espaciador interno transcrita (ITS) (White et al., 1990), EF1-728F y EF1-986R para la región del factor de elongación de la traducción 1-alfa (*tef-1α*) (Carbone & Kohn, 1999), y RPB2-5F y RPB2-7cR para la subunidad 2 de la ARN polimerasa II (*rpb2*) (Liu et al., 1999) (Tabla 2). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, se comprobó que los productos correspondan en pares de bases a lo descrito en literatura. Los productos de PCR se enviaron a Macrogen, Corea, para su secuenciación por el método Sanger. Posteriormente, se generaron secuencias consenso utilizando el programa Geneious Prime, y estas fueron comparadas mediante la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

2.5 Construcción de árboles filogenéticos

El árbol filogenético se realizó con las secuencias concatenadas de ITS, *rpb2* y *tef1-α*. El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa MEGA 11 mediante el algoritmo ClustalW (Tamura, 2021). Posteriormente, el árbol filogenético se creó con el software BEAST (v10.5.0), el cual emplea un enfoque bayesiano y el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR). Se empleó a *Stephilium versicarium* como grupo externo (outgroup). Y para evaluar la robustez y confiabilidad del árbol, se efectuaron 100 millones de interacciones (Figura 5).

RESULTADOS

3.1 Aislamiento y caracterización de los aislados obtenidos

Se obtuvieron 16 aislados, de los cuales 9, basados en sus características morfológicas, correspondieron a *Clonostachys* spp. Estos presentaron un micelio de color amarillo y blanco, con conidióforos penicilados que pueden ser dimórficos (primarios y secundarios). Los conidios observados fueron hialinos, de forma ovalada a subovalada (Zhao et al., 2023). Dos aislados presentaron características similares a lo descrito para *Fusarium* spp., caracterizadas por un micelio de color morado a rosado, con textura algodonosa. En estos aislados se observaron macroconidias alargadas, septadas, y microconidias pequeñas de forma elíptica (Tapia & Amaro, 2014). Se identificaron también dos aislados que, por sus características morfológicas, fueron catalogados como *Pythium* spp., presentando micelio blanco de textura algodonosa, junto con oosporas o esporangios de forma circular (Schroeder et al., 2013). Finalmente, se obtuvieron tres aislados cuyas características coincidieron con las descritas para *Alternaria* spp., mostrando micelios de color negro, oliváceo o grisáceo. Sus conidios fueron ovoides o elipsoidales, de color marrón pálido, con paredes lisas o verrugosas, y presentaron septos tanto transversales como longitudinales (Woudenberg et al., 2013) (Tabla 1).

3.2 Pruebas de patogenicidad en plantas sanas de *Solanum lycopersicum* cv. Pietro

A los 30 días post-inoculación se logró observar síntomas relacionados con la enfermedad únicamente a los aislados A1 y A2, identificados como *Alternaria* spp. Los tratamientos con el aislado A3 no presentaron sintomatología al igual que las plantas utilizadas como control. En las hojas inoculadas, se observaron lesiones concéntricas acompañadas de amarillamiento, mientras que en los tallos aparecieron lesiones necróticas superficiales. Al realizar un corte longitudinal, no se evidenció sintomatología interna. Ambos aislados mostraron los mismos

síntomas (Figura 1) (Figura 2). En el proceso de reaislamiento, se tomó tejido infectado de hojas y tallos, el cual fue desinfectado superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos y enjuagado con agua destilada estéril. Luego, se cultivó en medio PDA+G y se observó crecimiento de micelio a los 7 días. El micelio obtenido fue de color grisáceo o café, y se observaron conidios pardo-amarillentos y septados, con las mismas características de los aislados A1 y A2.

3.3 Identificación de las regiones de ADN

A partir de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger realizada en Macrogen (Corea), se generaron secuencias consenso para cada región genética. Para la región ITS, se del aislado A1 se obtuvo una secuencia de 539 pb y en el aislado 2 de 520 pb. En el caso del gen *tef-1α*, las secuencias fueron de 198 pb y 250 pb, respectivamente. Para el gen *rpb2*, se obtuvieron secuencias de 810 pb en el aislado 1 y 745 pb en el aislado 2. Posteriormente, se realizó un análisis BLAST, donde se encontró que la secuencia de la región ITS de ambos aislados (1 y 2) presentó un 100% de identidad con las secuencias de *Alternaria* spp. (MW729106.1), *Alternaria alternata* (ON413666.1), *Alternaria arborescens* (OW984532.1), *Alternaria burnsii* (KY484868.1) y *Alternaria alstroemерiae* (OP163642.1). De manera similar, la secuencia del gen *tef-1α* de los aislados 1 y 2 mostró un 100% de identidad con la secuencia de *Alternaria arborescens* (OK081881.1), y las secuencias del gen *rpb2* de los aislados 1 y 2 mostraron un 100% de identidad con las secuencias de *Alternaria arborescens* (OL469409.1) y (XM_028644303.1), respectivamente (Figura 4) (Figura 5).

3.4 Análisis filogenético

En el árbol filogenético, los aislados A1 y A2 se ubicaron dentro del clado de *Alternaria arborescens*, con un valor posterior de 0,99, lo que refleja un alto nivel de confiabilidad en la agrupación de especies (De Luna et al., 2005) (Figura 5).

DISCUSIÓN

La identificación y caracterización de los agentes fitopatógenos presentes en cultivos de tomate constituye un paso esencial para comprender la dinámica de las enfermedades que afectan a este cultivo de alto valor económico. En este estudio, se obtuvieron 16 aislados, pertenecientes a los géneros *Clonostachys* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp. y *Alternaria* spp. La identificación preliminar se basó en rasgos morfológicos como la forma y el color de las colonias, la morfología de las esporas y la estructura de los conidióforos, los cuales coincidieron con descripciones taxonómicas reportadas en la literatura especializada. Sin embargo, dado que la identificación basada únicamente en caracteres morfológicos puede ser imprecisa especialmente en géneros que incluyen especies saprofitas, oportunistas o patógenas de morfología similar, se reconoció la necesidad de emplear técnicas moleculares complementarias. Estas herramientas permiten confirmar la identidad específica de los aislados y establecer con mayor certeza su papel como agentes causales de enfermedad, evitando confusiones con microorganismos presentes como colonizadores secundarios o contaminantes (Raja et al., 2017).

La integración de métodos morfológicos y en base de ADN cobran mayor relevancia si se considera la frecuente ocurrencia de coinfecciones en cultivos de tomate. Casos documentados de interacción entre *Fusarium brachygibbosum*, *F. oxysporum* y *Ralstonia solanacearum*, lo que evidencia que múltiples organismos pueden estar simultáneamente asociados a un mismo cuadro fitopatológico (Liu et al., 2024). En consecuencia, un diagnóstico preciso y completo debe contemplar la posibilidad de interacciones complejas entre diversos patógenos, así como su diferenciación respecto a organismos saprofitos o contaminantes.

Las pruebas de patogenicidad realizadas revelaron que únicamente *Alternaria arborescens* (aislados A1 y A2) fue capaz de inducir lesiones necróticas en tallos de *S. lycopersicum*. La

infección se manifestó mediante la aparición de lesiones oscuras en hojas, formando anillos concéntricos rodeados por zonas cloróticas, así como cancros de color café oscuro a negro en los tallos, que coincide con los síntomas reportados por infecciones del género *Alternaria* en cultivos de tomate (Salotti et al., 2024). Las lesiones en los tallos fueron principalmente superficiales, lo que concuerda con la literatura, que describe a *A. arborescens* como un patógeno que actúa preferentemente sobre tejidos superficiales o senescentes (Agrios, 2005).

La naturaleza de los síntomas observados, como lesiones secas, localizadas y concéntricas, difiere claramente de los causados por bacterias fitopatógenas como *Ralstonia solanacearum* o *Xanthomonas* spp., las cuales generan marchitez sistémica, exudados acuosos, halos cloróticos de apariencia aceitosa o maceración húmeda de los tejidos (Mansfield et al., 2012). Esta distinción resulta clave para establecer el agente etiológico responsable de la enfermedad. En contraste con las bacterias, los hongos como *A. arborescens* secretan toxinas y enzimas que degradan las paredes celulares, dando lugar a lesiones secas, que concuerda con lo visualizado en el estudio (Meena et al., 2017).

Por otro lado, la ausencia de síntomas en las pruebas con otros géneros podría explicarse por su comportamiento como colonizadores no patógenos bajo las condiciones experimentales, o por la necesidad de condiciones ambientales específicas para expresar su virulencia. Adicionalmente, es posible que las características genéticas del cultivar Pietro, conocido por su resistencia frente a patógenos como *Fusarium oxysporum*, hayan influido en la ausencia de manifestaciones sintomáticas en los ensayos con este género (ImporAlaska, 2019; Salotti et al., 2024).

La identificación molecular de los aislados se basó en la amplificación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer), el gen de elongación del factor 1-alfa (*tef-1α*) y el gen de la subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*). Los fragmentos obtenidos presentaron tamaños

consistentes con los reportados para especies del género *Alternaria*, validando la precisión de la metodología utilizada. Estos marcadores han sido ampliamente usados para identificar *Alternaria* spp., dando una buena resolución a nivel de especie en el género *Alternaria* (Ramirez et al., 2023; Woudenberg et al., 2013).

El análisis filogenético multilocus posicionó a los aislados dentro del clado de *Alternaria arborescens*, con un soporte posterior de 0,99, lo que confirma la fiabilidad del enfoque multigénico como herramienta para la delimitación de especies en géneros complejos (Ramirez et al., 2023). Esto es relevante, ya que la región ITS por sí sola no siempre permite separar especies estrechamente relacionadas dentro de *Alternaria*, por lo que el uso combinado de marcadores es altamente recomendado (Pryor & Gilbertson, 2000). En conjunto, la aplicación de herramientas moleculares, como la amplificación de las regiones ITS, *rpb2* y *tef-1α*, junto con el análisis filogenético, permitió una identificación más precisa de los fitopatógenos aislados. Este enfoque resulta fundamental para establecer medidas de manejo eficaces y evitar errores en el diagnóstico basados exclusivamente en características morfológicas.

Este hallazgo es particularmente relevante, ya que *A. arborescens* ha sido reportado previamente como agente causal de tizón temprano en cultivos de papa en Europa (Landschoot et al., 2017) y de lesiones necróticas y marchitez en cultivos de tomate en Irak (Razak & Abass, 2021). Sin embargo, en Ecuador no existen reportes formales de su presencia en cultivos de tomate, por lo que este estudio constituye un posible primer registro de su asociación con esta enfermedad en el país. Hasta el momento, las únicas especies del género *Alternaria* reportadas en tomate en Ecuador corresponden a *A. solani*, en las provincias de Guayas y Santa Elena (Molina, 2011).

La detección de *A. arborescens* en invernaderos de Cotopaxi podría estar relacionada con las condiciones ambientales favorables que ofrece el sistema de cultivo bajo cubierta. Este hongo

prospera en temperaturas de entre 25 °C y 30 °C, y en ambientes con alta actividad de agua (0,950 – 0,995), condiciones que son comunes en este tipo de sistemas. Además, factores como el riego por aspersión, la alta densidad de plantas y la escasa rotación de cultivos pueden favorecer la acumulación del inóculo y facilitar su persistencia y diseminación (Salotti et al., 2024)

Desde una perspectiva fitosanitaria, el registro de *A. arborescens* afectando tomate en Ecuador adquiere gran relevancia. Si no se adoptan medidas de manejo oportunas, la enfermedad podría expandirse a otras zonas productoras, comprometiendo la sanidad del cultivo. Entre las estrategias de control recomendadas se incluyen el monitoreo continuo del microbioma del suelo y de la planta, la implementación de prácticas como la rotación de cultivos y el manejo de la humedad, así como el uso de fungicidas específicos (Gómez & Núñez, 2019). Asimismo, el empleo de agentes de control biológico como *Trichoderma* spp., reconocido por su efecto antagonista sobre *Alternaria* spp., representa una alternativa prometedora para un manejo sostenible (Jiménez, 2022).

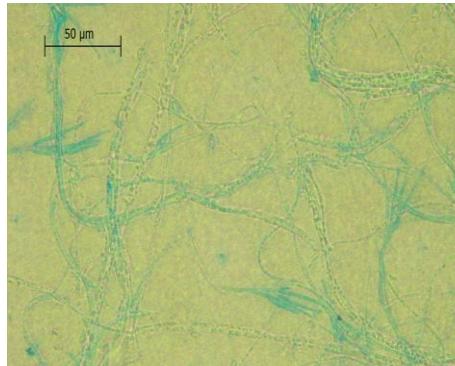
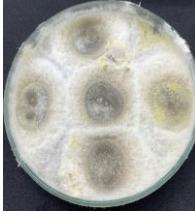
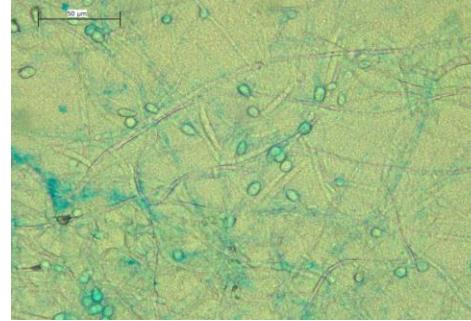
En conjunto, los resultados obtenidos no solo permiten establecer con certeza el agente etiológico de la enfermedad en el sitio de estudio, sino que también sientan las bases para investigaciones futuras enfocadas en la vigilancia fitosanitaria y el desarrollo de estrategias sostenibles de manejo en el cultivo de tomate.

CONCLUSIONES

A través del aislamiento y su posterior caracterización morfológica, se obtuvieron 16 microorganismos pertenecientes a los géneros *Clonostachys* spp. (9), *Fusarium* spp. (2), *Pythium* spp. (2) y *Alternaria* spp. (3). Sin embargo, las pruebas de patogenicidad evidenciaron que únicamente los aislados A1 y A2, identificados molecularmente como *Alternaria arborescens* mediante el análisis de las regiones ITS, *tef-1α* y *rpb2*, fueron capaces de reproducir los síntomas observados en campo. El análisis filogenético corroboró esta identificación, posicionando ambos aislados dentro del clado de *A. arborescens* con un alto valor de posterior (0,99). Estos resultados destacan la necesidad de integrar enfoques morfológicos, moleculares y filogenéticos para lograr una identificación precisa de fitopatógenos en cultivos de importancia económica como el tomate. El presente estudio logró aislar e identificar a *Alternaria arborescens* como el principal agente fitopatógeno asociado a lesiones necróticas en tallos de *Solanum lycopersicum* cv. Pietro en cultivos de la provincia de Cotopaxi, Ecuador. Este hallazgo constituye un primer registro de la presencia de esta especie en cultivos de tomate en el país, con importantes implicaciones para la producción agrícola debido a su impacto potencial en la calidad y el rendimiento del cultivo.

TABLAS

Tabla 1. Caracterización macro y microscópica de los 16 microorganismos aislados obtenidos de plantas enfermas de *Solanum lycopersicum*

Código	Identificación macroscópica	Identificación microscópica
C1		
C2		
C3		
C4		
C5		
C6		
C7		
C8		
C9	Possible <i>Clonostachys</i> spp.	
F1		
F2	Possible <i>Fusarium</i> spp.	

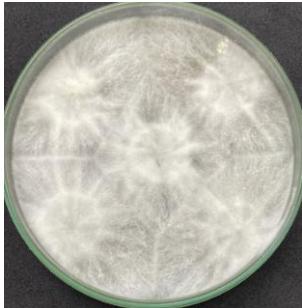
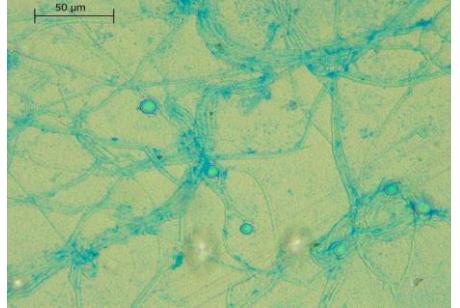
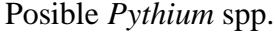
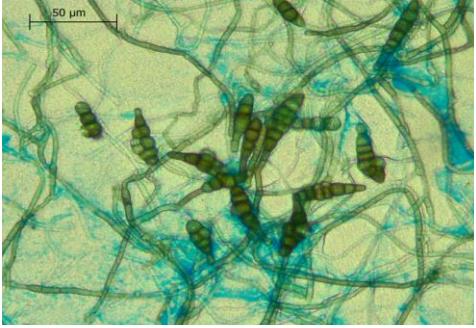
P1			
P2			
A1			
A2			
A3			

Tabla 2. Condiciones de las PCRs con los primers utilizados para amplificar las regiones ITS, *rpb2* y *tef-1α* de *Alternaria arborescens*

Primer	Secuencia (5'-3')	Condiciones	Pares de bases	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	94°C a 3min, 30 ciclos (94°C a 1min, 58°C a 1min, 72°C a 1min) y 72°C a 10min	500-600pb	(White et al., 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	94°C a 5min, 35 ciclos (94°C a 30s, 59°C a 30s, 72°C a 45s) y 72°C a 7min	300pb	(Liao et al., 2023)
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC			
RPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	95°C a 5min, 35 ciclos (95°C a 1min, 55°C a 2min, 72°C a 1,5min) y 72°C a 10min	1200pb	(Shenoy et al., 2006)
RPB2-7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT			

FIGURAS

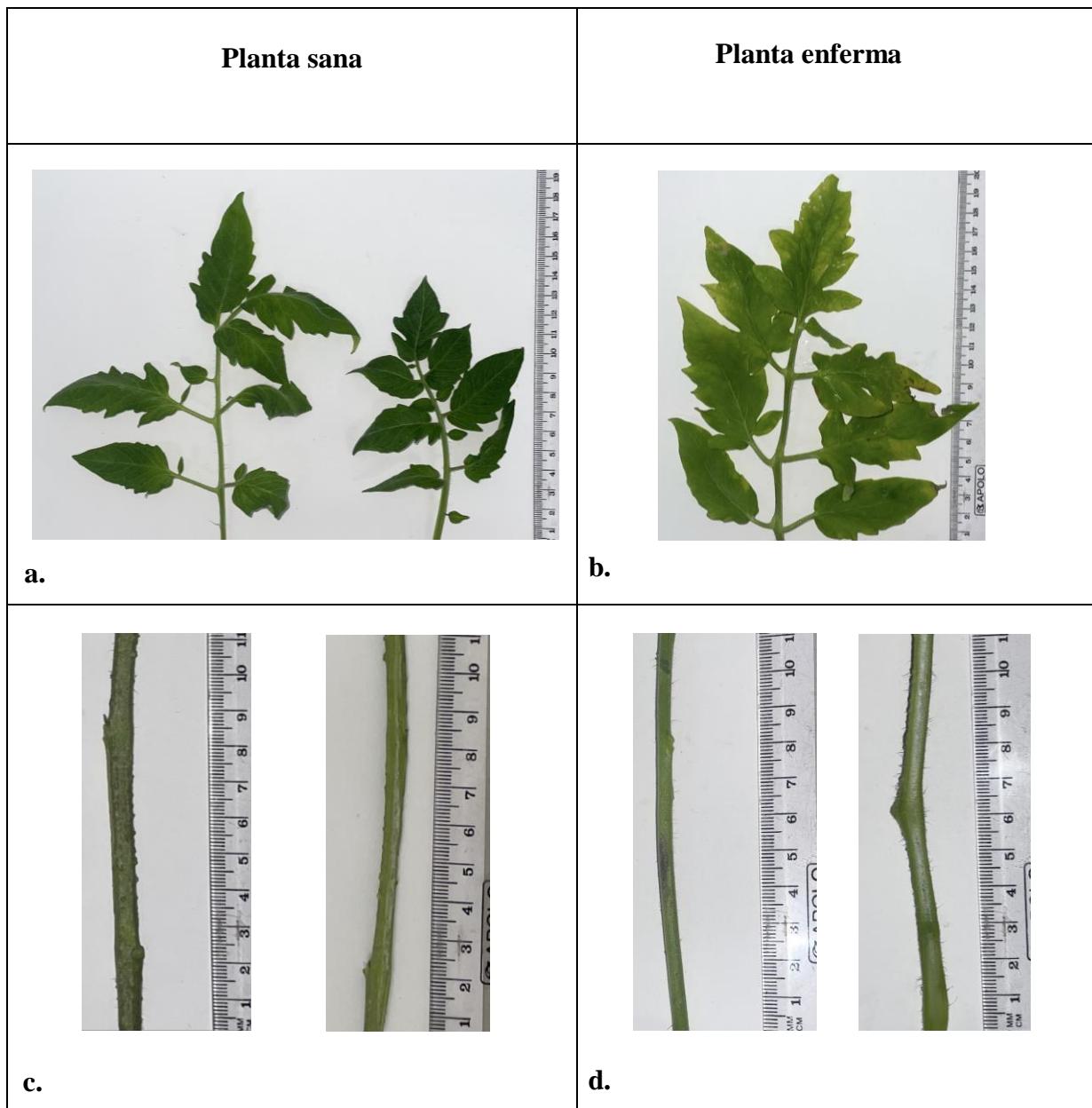


Figura 1. Resultados de las pruebas de patogenicidad en hojas y tallos con el aislado A1, **A.** Hoja sana, **B.** Hoja enferma, **C.** y **D.** Tallos y cortes longitudinales (planta sana y planta enferma)

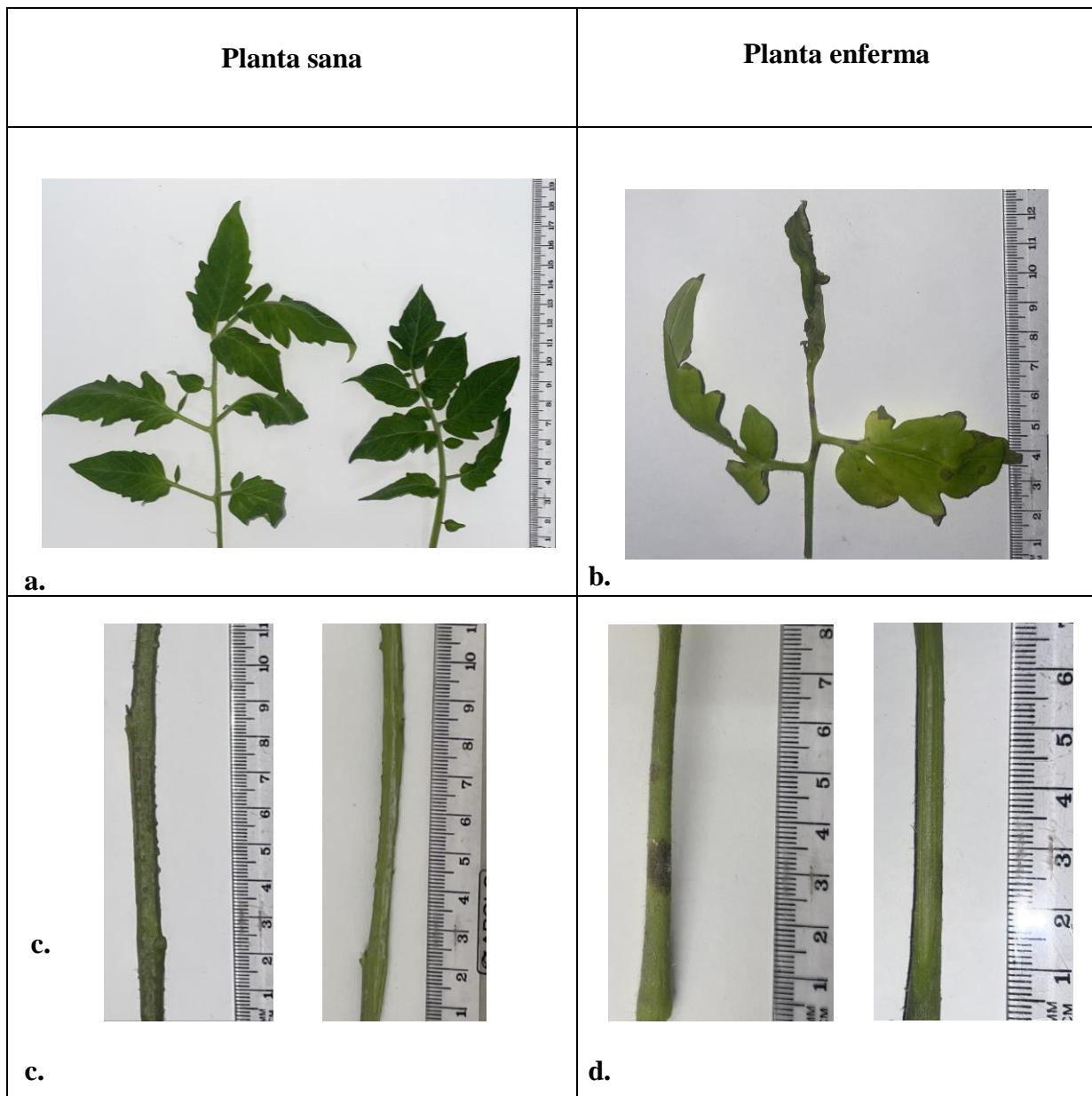


Figura 2. Resultados de las pruebas de patogenicidad en hojas y tallos con el aislado A2, A. Hoja sana, B. Hoja enferma, C. y D. Tallos y cortes longitudinales (planta sana y planta enferma)

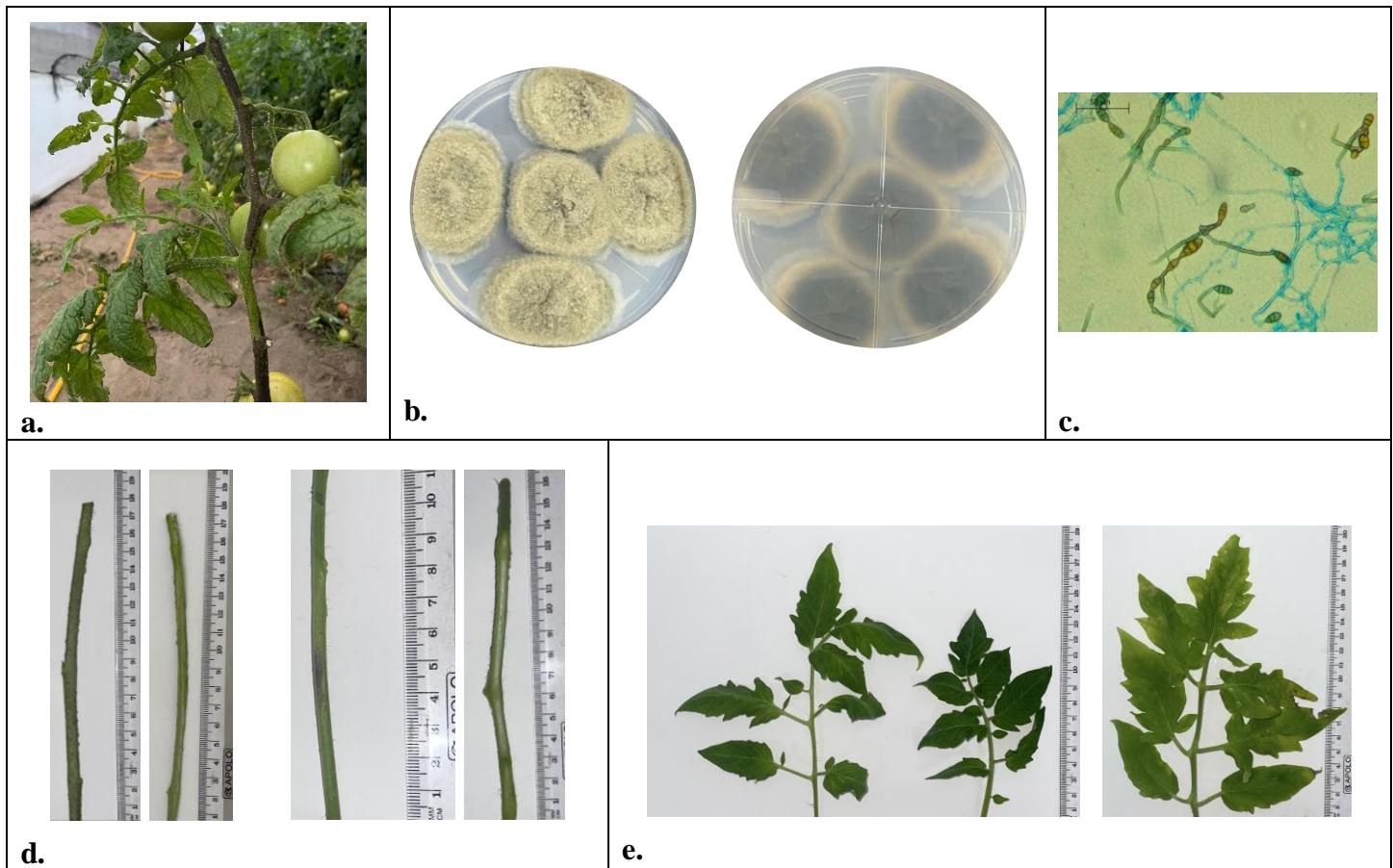


Figura 3. Resultados combinados con *Alternaria arborescens* aislado A1, **A.** Foto de la enfermedad en campo, **B.** Macroscopia, **C.** Microscopía (40X), **D.** y **E.** Resultados de los ensayos de patogenicidad del control y la planta inoculada (tallos y hojas)

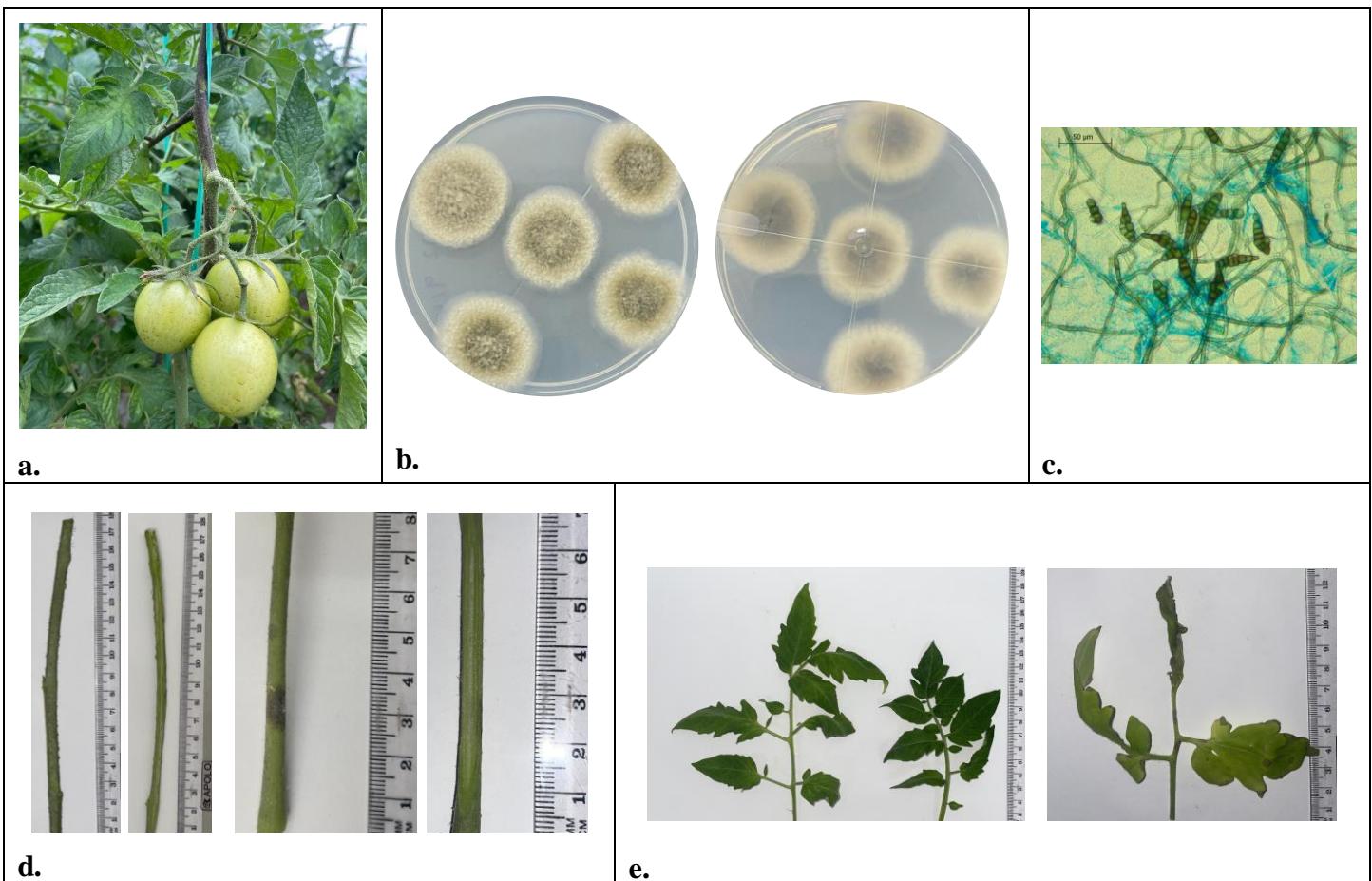


Figura 4. Resultados combinados con *Alternaria arborescens* aislado A2, **A.** Foto de la enfermedad en campo, **B.** Macroscopia, **C.** Microscopía (40X), **D.** y **E.** Resultados de los ensayos de patogenicidad del control y la planta inoculada (tallos y hojas)

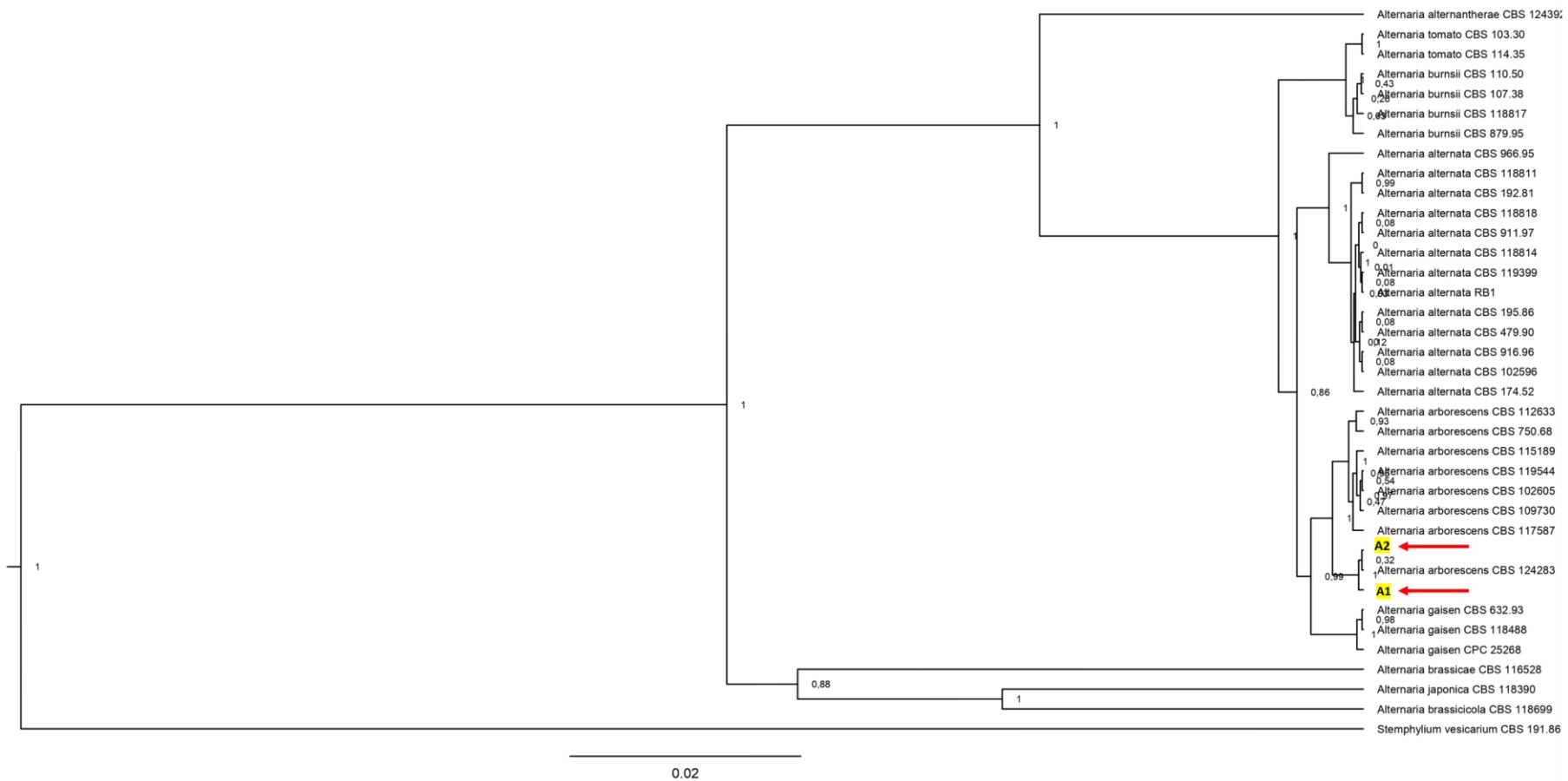


Figura 5. Árbol filogenético de los aislados A1 y A2. Construido a partir de secuencias concatenadas de las regiones ITS, *tef-1a* y *rpb2*, mediante un análisis bayesiano con el modelo de sustitución GTR utilizando el software BEAST (v10.5.0). El resultado muestra que los aislados A1 y A2 se agrupan dentro del clado de *Alternaria arborescens*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). Plant pathology. Fifth edition. Elsevier.
- Arroyo, W., Torres, C., Salinas, A., Santillán, D., Rivera, L., Párraga, A., ... & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.
- Ascencio, A., López, A., Borrego, F., Rodríguez, S., Flores, A., Jiménez, F. & Gámez, A. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología* , 26 (2), 114-120.
- Blancard, D. (2013). Tomato diseases: Identification, biology and control: A colour handbook (2nd ed.). CRC Press.
- Carbone, I., & Kohn, L. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Castillo, F., Siller, M., Camargo, J., & Chávez, A. (2001). Grupos de anastomosis *Rhizoctonia solani* de la región papera de Toluca, Estado de México y susceptibilidad In vitro a fungicidas de diferente grupo toxicológico. *Agraria*, 17(2), 59-67.
- Cruz, R., González, J. & Sánchez, P. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 6-15.
- De Genring, L., & Poleatewich, A. (2023). The Effect of Tomato Cultivar on Pythium Root Rot and Efficacy of Biopesticides. *PhytoFrontiers™*, 3(3), 594-601.
- De Luna, E., Guerrero, J. & Chew, T. (2005). Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*, 15(3), 351-370.
- El Comercio. (2011). Ocho variedades de tomate riñón están en los mercados locales.
<https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/ocho-variedades-de-tomate-rinon.html>
- Espinoza, L. (2009). Conservación de agentes patógenos y epífitos presentes en los cultivos de tomate, sandía y banano y sus beneficios para la investigación. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 22(1).
- Gómez, A., Hernández, E., Ahumada, C., Herrera, R., Martínez, M., Ramírez, E. & Drouaillet, B. (2022). Principales enfermedades del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de campo. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinaria* , 6 (1), 4190-4210.

- Gómez, M. & Nuñez, C. (2019). Evaluación de fungicidas para el control de *Alternaria* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de laboratorio (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2019.).
- Htun, A., Aung, S., He, L., Liu, H. & Deng, J. (2020). First report of *Alternaria blumeae* causing leaf blight on tomato in Myanmar. *Plant Dis.*
- ImporAlaska. (2019). Tomate híbrido Pietro. <https://www.imporalaska.com/tomates/tomate-hibrido-pietro>
- INEC. (2023). Instituto Nacional de Estadística y Censos. Boletín situacional de tomate riñón 2023. <https://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/situacionales-agricolas/situacional-tomaterinon>
- Jiménez, J. (2022). Evaluación in vitro de aislados de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Alternaria* sp., en *Selenicereus* sp.(PITAHAYA), en La Joya de los Sachas.
- Kapli, P., Yang, Z. & Telford, M. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 428-444.
- Landschoot, S., Vandecasteele, M., De Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2017). Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato. *Fungal Biology*, 121(2), 172-188.
- Liao, Y., Cao, Y., Wan, Y., Li, H., Li, D. & Zhu, L. (2023). *Alternaria arborescens* and *A. italica* Causing Leaf Blotch on *Celtis julianae* in China. *Plants*, 12(17), 3113.
- Liu, J., Deng, S., Chang, W., & Wang, H. (2023). First report of tomato wilt caused by *Fusarium brachygibbosum* in China. *Plant Disease*, 107(9), 2844.
- Liu, J., Deng, S., Chang, W., Yu, D., & Wang, H. (2024). Development of a Multiplex PCR Assay for the Detection of Tomato Wilt Caused by Coinfection of *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium oxysporum*, and *Ralstonia solanacearum* Based on Comparative Genomics. *Plant disease*, 108(5), 1128–1138.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-23-0962-SR>
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution*, 16(12), 1799-1808.
- Liu, Y., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X. & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & cell*, 12(5), 315-330.
- Magallanes, A. (2022). Evaluación productiva del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en dos sustratos sólidos bajo un sistema hidropónico NFT (Universidad Agraria del Ecuador).
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., ... & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.

- Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2017). Alternaria toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 8, 1451.
- Molina, M. (2011). Identificación y evaluación de antagonistas del tizón temprano (*Alternaria solani*) en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). Ecuador (Doctoral dissertation, Tesis de Grado]. Previa la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Milagro. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias).
- Muñoz, V., Cisterna, V., France, A. (2020). Aislamiento de microorganismos fitopatógenos [en línea]. Chillan: Boleetín INIA – Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Nº 428, 77-91. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67165>
- Ortega, J., Gutiérrez, K., Velázquez, R., Piguave, C., Campana, W. & López, G. (2022). Evaluación y selección de híbridos de tomate *Solanum lycopersicum* L.(Mill.) en Puerto la Boca, Ecuador. *Revista de la Biosfera Selva Andina* , 10 (1), 21-31.
- Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., ... & Matić, S. (2021). A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the mediterranean basin. *Agronomy*, 11(11), 2188.
- Pryor, B. & Gilbertson, R. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological research*, 104(11), 1312-1321.
- Raja, H., Miller, A., Pearce, C. & Oberlies, N. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
- Ramirez, D., Barriga, N., Llerena, S., Pazmino, C., & Leon, A. (2023). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on broccoli in ecuador. *Plant Disease*, 107(9), 2866.
- Razak, N. & Abass, M. (2021). First report of *Alternaria arborescens* causing early blight on tomato in Iraq: Short notes. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 34(1), 230-232.
- Salotti, I., Giorni, P., & Battilani, P. (2024). Biology, ecology, and epidemiology of *Alternaria* species affecting tomato: ground information for the development of a predictive model. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1430965.
- Schroeder, K., Martin, F., de Cock, A., Lévesque, C., Spies, C., Okubara, P. & Paulitz, T. (2013). Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant disease*, 97(1), 4-20.
- Shenoy, B., Jeewon, R., Wu, W., Bhat, D. & Hyde, K. (2006). Ribosomal and RPB2 DNA sequence analyses suggest that *Sporidesmium* and morphologically similar genera are polyphyletic. *Mycological research*, 110(8), 916-928.

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género Fusarium. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Woudenberg, J., Groenewald, J., Binder, M. & Crous, P. (2013). Alternaria redefined. *Studies in mycology*, 75(1), 171-212.
- Yurchenko, E., Karpova, D., Burovinskaya, M., & Vinogradova, S. (2024). Leaf Spot Caused by Alternaria spp. Is a New Disease of Grapevine. *Plants*, 13(23), 3335.
- Zamora, D. (2023). Manejo integrado de Phytophthora infestans en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en Ecuador (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2023).
- Zhao, L., Groenewald, J., Hernández, M., Schroers, H. & Crous, P. (2023). Revising Clonostachys and allied genera in Bionectriaceae. *Studies in Mycology*, 105(1), 204-265.

ANEXOS

Anexo 1. Composición nutricional de los medios PDA, V8 y Dox-Czapek empleados en el cultivo de hongos y oomicetos

PDA	
Dextrosa	20.0g/L
Agar-Agar	15.0g/L
Extracto de patata	4.0g/L
V8	
Jugo V8	200ml/L
Maltosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	20g/L
Asparagina ($C_4H_8N_2O_3$)	1g/L
Extracto de malta ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	10g/L
Carbonato de calcio ($CaCO_3$)	3g/L
Agar	15g/L
Dox-Czapek	
Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	30g/L
Nitrato de sodio ($NaNO_3$)	3g/L
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1g/L
Cloruro de potasio (KCl)	0.5g/L
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$)	0.5g/L
Sulfato ferroso ($FeSO_4$)	0.01g/L
Agar	21g/L

Anexo 2. Composición de la solución Hoagland como medio nutritivo para el desarrollo de plantas

Nutrientes	Cantidad por litro
Macronutrientes	
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	6 g
Nitrato de Calcio Ca (NO ₃) ₂	4 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado MgSO ₄	2 g
Fostato Diácido de Amonio (NH ₄ H ₂ PO ₄)	1 g
Micronutrientes	
Hierro (Fe)	1.0 mg
Manganoso (Mn)	0.5 mg
Boro (B)	0.5 mg
Zinc (Zn)	0.05 mg
Cobre (Cu)	0.02 mg
Molibdeno (Mo)	0.01 mg