



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**EFEECTO DE TRES CONCENTRACIONES DEL RESIDUO DEL
ENDULZADO DE CHOCHO SOBRE *Alternaria* sp y *Brevicorine
brasicae* L. (PULGÓN) EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica
oleracea* L.) EN LABORATORIO.**

TRABAJO DE TITULACIÓN
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA TITULACIÓN DE
GRADO

OSCAR EDUARDO ORTUÑO VALLEJO

Riobamba – Ecuador
2019

Derechos de Autor Copyright

©201X, Oscar Eduardo Ortuño Vallejo

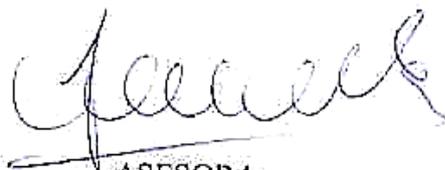
Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRNÓMICA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **EFFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DEL RESIDUO DEL ENDULZADO DE CHOCHO SOBRE *Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae* L. (PULGÓN) EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea* L.) EN LABORATORIO**. De responsabilidad del señor, Oscar Eduardo Ortuño Vallejo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.



DIRECTOR
ING. EDWIN LEONARDO PALLO PAREDES



ASESORA
ING. NORMA SOLEDAD ERAZO SANDOVAL

Responsabilidad y derechos compartidos

Yo, Oscar Eduardo Ortuño Vallejo soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en cooperación con la fundación Maquita Cushunchi Chimborazo (MCCH).



.....
Oscar Eduardo Ortuño Vallejo
060383885-5.

Dedicatoria

Quiero dedicar mi éxito primeramente a Dios quien me ha dado la vida, fortaleza, sabiduría y salud para poder cumplir con un objetivo de vida.

A mi madre María Isabel Vallejo Zumba quien con su inmenso amor, comprensión y apoyo he logrado culminar con mi carrera, por creer en mí y que con su ejemplo ha nunca darme por vencido e intentar una vez más, por lo que aprendí a que todo se logra si uno se lo propone. Gracias por ser la mejor mama.

A mi padre Luis Alfredo Morales por apoyarme siempre pese a cualquier problema que se ha presentado.

A mis hermanos, familia y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo a lo largo de mi carrera

Agradecimientos

A mi madre y a mi padre por su apoyo incondicional

A mis tíos por su apoyo y su tolerancia

A, mis hermanos y mis amigos por acompañarme

Al Ingeniero Edwin Pallo por su apoyo durante el trabajo de titulación

Al ingeniero Juan Manzano por su guía.

A Maqita Cushunchi Chimborazo por el apoyo y la confianza brinda

Al laboratorio de Ciencias Biológicas en el departamento de microbiología, por su apertura para la realización del trabajo de titulación.

Índice

I. EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DEL RESIDUO DEL ENDULZADO DE CHOCHO SOBRE <i>Alternaria</i> sp y <i>Brevicorine brassicae</i> L. (PULGÓN) EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (<i>Brassica oleracea</i> L.) EN LABORATORIO.	1
II. INTRODUCCIÓN	1
III. IMPORTANCIA.....	1
IV. PROBLEMA	1
V. JUSTIFICACIÓN	2
VI. OBJETIVOS.....	3
A. GENERAL.....	3
B. ESPECÍFICOS	3
VII. HIPÓTESIS	4
A. HIPÓTESIS NULA.....	4
B. HIPÓTESIS ALTERNANTE	4
C. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	4
VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
A. CULTIVO DE BRÓCOLI	5
1. Importancia del cultivo de brócoli.....	5
2. Descripción taxonómica.....	5
3. Fenología del cultivo de brócoli.	6
4. Requerimientos de suelo y clima.....	6
5. Manejo del cultivo de brócoli.....	6
B. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES.....	7
1. <i>Alternaria</i> sp.....	7
2. <i>Brevicorine brassicae</i> , L (Pulgón).....	11
3. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESIDUOS DEL ENDULZADO DE CHOCHO.	13
IX. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	16
1. Localización	16
2. Ubicación geográfica	16
3. Condiciones de laboratorio	16
B. MATERIALES Y EQUIPOS.....	16
1. Materiales.....	16
2. Equipos.	17
3. Reactivos.....	17
C. MÉTODOS	17
1. Metodología.....	17
D. ESPECIFICACIONES DEL EXPERIMENTO	21
E. TIPO DE DISEÑO.....	22
F. VARIABLES EN ESTUDIO.....	23
X. RESULTADOS	26
XI. CONCLUSIONES	34
XII. RECOMENDACIONES	35
XIII. RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
XIV. ZUMMARY.....	37
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	38
XIV. ANEXOS.....	39

Índice de tablas

Tabla 8.1. Clasificación taxonómica de la planta de brócoli.....	5
Tabla 8. 2. Taxonomía de <i>Alternaria</i> sp	8
Tabla8. 3. Clasificación taxonómica de <i>Brevicorine brassicae</i> . L, (pulgón).....	11
Tabla 9. 4. Escala de daño de la enfermedad <i>Alternaria</i> sp	20
Tabla 9. 6. Tratamientos en estudio.	22
Tabla 9. 7. Análisis de Varianza (ADEVA) para <i>Alternaria</i> sp.....	23
Tabla9. 8. Análisis de Varianza (ADEVA) para <i>Brevicorine brassicae</i> . L, (pulgón),	23
Tabla 10. 9. Análisis de varianza para la tasa de crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> sp.	26
Tabla 10. 10. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición micelial en <i>Alternaria</i> sp.....	27
Tabla 10.11. Grado de severidad de <i>Alternaria</i> sp en fragmentos de hojas de brócoli. ..	29
Tabla 10.12. Análisis de variancia para el porcentaje de repelencia <i>Brevicorine brassicae</i> , L. (pulgón).	31
Tabla 10.13. Análisis de varianza para la tasa de mortalidad de pulgones <i>Brevicorine brassicae</i> , L. (pulgón).....	32

Índice de figuras

Figura 8. 1. Ciclo de vida de alternaría sp como un patógeno de vegetales.	9
<i>Figura 8 2.</i> Análisis del agua residual del chocho. Fuente. (CESTTA, 2016)	14
Figura 8 3. Contenido de amino ácidos esenciales en el tarwi crudo, desamargado con agua y con alcohol (g amino acid/16g N) (Carrasco, 2014)	14
Figura 10. 4. Tasa de crecimiento micelial de Alternaria sp en medio sintético.	27
Figura 10. 5. Porcentaje de inhibición micelial de Alternaria sp.	28
Figura10.7. Porcentaje de severidad de Alternaria sp en fragmentos de hojas de brócoli.	30
Figura 10.8. Porcentaje de repelencia de Brevicorine brassicae, L.(pulgón)	32
Figura 10.9. Tasa de mortalidad de pulgones. (Brevicorine brassicae, L.).....	33

Índice de anexos.

Anexo 1. Metodología: fase de campo. Recolección de muestras.....	39
Anexo 2. Identificación bajo microscopio de <i>Alternaria</i> sp recolectada de cultivos de brócoli infestados.	39
Anexo 3. Preparación de los medios para la inoculación de <i>Alternaria</i> sp.	40
Anexo 4. Pruebas de patogenicidad en fragmentos de hojas de brócoli.	40
Anexo 5. Efectos del residuo del endulzado de chocho sobre pulgones.	41
Anexo 6. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de <i>Alternaria</i> sp en medio sintético.....	42
Anexo 7. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de <i>Alternaria</i> sp en medio sintético.	43
Anexo 8. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de <i>Alternaria</i> sp en medio sintético.	44
Anexo 9. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de <i>Alternaria</i> sp en medio sintético.	45
Anexo 10. Numero de esporas producidas	46
Anexo 11. Conteo de esporas de las tres repeticiones del tratamiento absoluto en la cámara de Neubauer, obteniendo un promedio de 108 esporas y una solución de 2.7×10^5	46
Anexo 12. Guía de identificación de características morfológicas de las colonia	47
Anexo 13. Escalas de colores de verde.	47
Anexo 14. Identificación de las características morfológicas de las colonias de <i>Alternaria</i> sp.	48
Anexo 15. Pruebas de antagonismo en tejido vegetal sano.	49
Anexo 16. Escala descriptiva de severidad de <i>Alternaria</i> sp.....	50
Anexo 17. Evaluación de la incidencia de <i>Alternaria</i> sp sobre fragmentos de hojas.....	50
Anexo 18. Evaluación de la severidad de <i>Alternaria</i> sp sobre fragmentos de hojas de brócoli.....	51
Anexo 19. Captura de pulgones de cultivos de brócoli infestados	52
Anexo 20. Pruebas sobre pulgones. Evaluación de la repelencia de los residuos.	53
Anexo 21. Pruebas sobre pulgones. Evaluación de la de la tasa de mortalidad.	54

Lista de abreviaturas

MCCH	Maquita Cushunchi Chimborazo
PDA	Agar Papa Dextrosa
dc	Diámetro del micelio control
dt	Diámetro del micelio del tratamiento
T	Tratamiento
DCA	Diseño completo al z
ADEVA	Análisis de varianza
NaClO	Hipoclorito de sodio
H ₂ O _d	Agua destilada
μl	Microlitro
ml	Mililitro
g	Gramo
mm	Milímetros
°C	Grados Celsius
t	Toneladas
tm	Toneladas métricas
ns	No significativo
**	Altamente significativo
*	significativo

I. EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DEL RESIDUO DEL ENDULZADO DE CHOCHO SOBRE *Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae* L. (PULGÓN) EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea* L.) EN LABORATORIO.

II. INTRODUCCIÓN

La alta demanda del brócoli en mercados internacionales trajo buenos resultados al sector agrícola. La producción nacional del año 2016, presentó similar comportamiento a la producción internacional, aumentando de forma considerable en 12,5% con respecto al año 2015, reportando un rendimiento de 74 910 t de brócoli exportados. (SINAGAP, 2016)

Sin embargo el cultivo sucesivo ha provocado problemas fitosanitarios a los que tienen que enfrentarse los productores de brócoli además de los requisitos impuestos por las normas de calidad de los países destino, relacionando con la presencia de residuos de plaguicidas, enfermedades y plagas los que repercuten en los precios y en la calidad del producto.

Los rendimientos y la calidad del producto se ven afectados por la presencia de plagas y enfermedades siendo las de mayor importancia económica *Alternaria* sp, conocida como mancha de las crucíferas y los áfidos que afectan directamente en el rendimiento del cultivo de brócoli.

La búsqueda de alternativas de control de plagas y enfermedades se ha enfatizado en los últimos años, en la utilización de extractos vegetales, como otra opción los subproductos de las industrias, macerados, etc.

Los residuos del endulzado de la planta procesadora de chocho de la parroquia Chugchilan están siendo utilizados por los agricultores de manera empírica para el manejo de varias plagas y enfermedades lo que lleva a realizar investigaciones en cuanto a las dosis, concentraciones para el manejo de (*Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae*, L) del cultivo de brócoli.

III. IMPORTANCIA.

El chocho es uno de los principales rubros de los agricultores de la parroquia Chugchilan, siendo el proceso de endulzado del chocho el que genera grandes cantidades de residuos líquidos que no tiene un fin adecuado, este producto podría constituirse en una alternativa para el manejo de plagas y enfermedades en cultivos hortícolas, como el brócoli.

IV. PROBLEMA

El abuso de agroquímicos en la producción agrícola convencional ha contribuido a que se incremente los problemas fitosanitarios, debido a la resistencia de patógenos y plagas, al eliminar principalmente a los enemigos naturales, los cuales mantienen un ecosistema regulado, evidenciando en la pérdida del equilibrio natural.

El residuo del endulzado de chocho se utiliza de una forma empírica existiendo un desconocimiento

Referente a las concentraciones o dosis que se debe emplear como una alternativa amigable con el ambiente para obtener un buen manejo de las plagas y enfermedades en el cultivo de brócoli.

V. JUSTIFICACIÓN

Actualmente suelen utilizar el residuo del endulzado de choco como alternativa de manejo para plagas y enfermedades en el cultivo de brócoli.

Sin embargo se está utilizando estas alternativas biodegradables para el manejo de plagas y enfermedades de forma empírica, su uso es diferente en función de las concentraciones y dosis, debido a que no se conoce los verdaderos efectos de estos residuos y cuáles son las concentraciones que ejerzan un manejo eficiente de plagas y enfermedades en el cultivo de brócoli, sin alterar los ecosistemas, es por esta razón que la presente investigación plantea realizar el estudio de las concentraciones de los residuos del endulzado de chocho para el manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de brócoli.

VI. OBJETIVOS

A. GENERAL

Evaluar el efecto de tres concentraciones de residuos del endulzado de chocho sobre *Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae*, L. (pulgón) en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*, L), en laboratorio.

B. ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de tres concentraciones del endulzado de chocho sobre el desarrollo de (*Alternaria* sp.)
2. Evaluar el efecto de tres concentraciones del endulzado de chocho sobre (*Brevicorine brassicae* L.) pulgones en brócoli (*Brassica oleracea* L.)

VII. HIPÓTESIS

A. HIPÓTESIS NULA

Ninguna concentración de los residuos del endulzado de chocho tiene efecto sobre (*Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae* L) pulgón en el cultivo de brócoli

B. HIPÓTESIS ALTERNANTE

Al menos una concentración de los residuos del endulzado de chocho tiene efecto sobre (*Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae* L), pulgón en el cultivo de brócoli

C. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

1. Variable dependiente

a. *Alternaria* sp;

- 1) Porcentaje de afectación
- 2) Severidad en tejido inoculado

b. Pulgón

- 1) Individuos afectados
- 2) Individuos muertos

2. Variable independiente

- a. Residuos del endulzado de chocho
- b. Concentraciones de residuos del endulzado de chocho

VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. CULTIVO DE BRÓCOLI

1. Importancia del cultivo de brócoli

El brócoli es una planta de la familia de las Brassicaceae, originaria del Mediterráneo y Asia Menor, se lo consume en fresco: en ensaladas, sopas, entre otras. El consumo de este producto se ha incrementado en los últimos años, principalmente por su gran cantidad de atributos nutritivos y anti cancerígenos. (SINAGAP, 2016)

Debido al incremento en la demanda mundial, la producción del brócoli, entre el año 2000 al 2012, registró un crecimiento del 41.88%, pasando de 14 989,000 toneladas producidas en el año 2000 a 21 266,789 toneladas en el 2012; presentando así, una tendencia positiva en este periodo de tiempo, con una tasa de crecimiento anual promedio de 2.99%. (SINAGAP, 2016)

Desde el año 2000 al 2012, la evolución de la superficie cosechada de brócoli en Ecuador ha tenido un incremento de 9.27%; pasando de 3,330 hectáreas en el año 2000 a 3,639 hectáreas en el 2012. (SINAGAP, 2016)

Ecuador exportó 56 mil toneladas, siendo el séptimo país exportador a nivel mundial; el 72.96% de estas tuvieron como destino Estados Unidos, Japón y Alemania. (SINAGAP, 2016)

Según SINAGAP (2014). En Ecuador la superficie cosechada de brócoli en el año 2012 alcanzó las 3,639 hectáreas, distribuidas en ocho provincias, con una producción total de 70,000 toneladas y un rendimiento de 19.24 tm/ha.

Las provincias de Cotopaxi y Pichincha registran la mayor cantidad de superficie cosechada de brócoli, ocupando el 82.00% de la superficie total nacional. Cotopaxi es la provincia con mayor producción (51,350 toneladas) y con un rendimiento de 28.22 tm/ha. (SINAGAP, 2016)

2. Descripción taxonómica

Tabla 8.1. *Clasificación taxonómica de la planta de brócoli*

Nombre Científico:	<i>Brassica oleracea var. ItalicaPlenck</i>
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Brassicales
Familia:	Brassicaceae
Género:	Brassica

Especie: Oleracea var. italica

Nota. (CORPOICA, 2016)

3. Fenología del cultivo de brócoli.

El brócoli presenta 3 estados fenológicos:

- a. Vegetativa inicial (VI): En la cual se consolidan procesos de producción de biomasa foliar, el cual se caracteriza por la enorme cinética de formación de hoja, con altos índices de fotosíntesis y respiración celular, donde la morfología de hoja es típica de este período y esta, varía con la de ciclos posteriores tanto en calidad como en cantidad. Fisiológicamente esta etapa debe consolidarse en su totalidad, de esta depende que la planta ingrese a posteriores periodos sin presencia de producto o metabolismo carencial. (Orellana, Solórzano, Bonilla, Salazar, & Velasteguí, 2008)
- b. Vegetativo medio (VM): En la cual se caracteriza por fases en las cuales los procesos de formación de biomasa no son definitivamente cuantitativos sino más bien cualitativos. La biomasa foliar tiene proyecciones inductivas para la formación de bases florales y los primeros eventos de formación de primordios foliares. En esta etapa se diferencia metabólicamente porque los fotosintatos producidos por la planta se dirigen a la consolidación de la formación de la pella. (Orellana, Solórzano, Bonilla, Salazar, & Velasteguí, 2008)
- c. Inducción floral (IF): O formación de pella, por medio de la cual se inicia agresivamente la formación de yemas apicales, tanto en puntos de crecimiento de dominancia apical, como en domos laterales de la base de tallo diferenciado. En esta fase los fotosintatos se dirigen con toda su capacidad a la formación de bases de sustentación de primordios florales. (Orellana, Solórzano, Bonilla, Salazar, & Velasteguí, 2008)

4. Requerimientos de suelo y clima

El brócoli es una hortaliza que se desarrolla favorablemente en climas fríos y frescos, tolerando temperaturas de hasta -2°C, siempre y cuando no esté presente la inflorescencia en la planta, de lo contrario será fácilmente dañada por la baja de temperatura. La temperatura óptima de desarrollo es de 17 °C. Se adapta casi a cualquier tipo de suelos, pero, como todos los vegetales, prefiere suelos no muy ligeros, uniformes, profundos con buen drenaje y con un pH óptimo de 6 a 7.5 (aunque soporta de 5 a 5.5 de pH). (Santoyo & Martínez , 2010)

5. Manejo del cultivo de brócoli

a. Siembra

Puede ser establecido de forma directa o trasplante, pero actualmente la mejor forma de establecimiento es a través de trasplante, debido que las nuevas variedades requieren de la siembra en charolas para aprovechar el 100 % de la semilla que se compra a las casas comercializadoras. (Santoyo & Martínez , 2010)

b. Riego.

Esta actividad se recomienda sea realizada dos veces por semana. Durante la primera semana de trasplante, serán tres horas de riego; durante la segunda y tercera semanas después del trasplante, se recomienda realizar los riegos por dos horas. A partir de la cuarta semana, el riego solo será para refrescar al cultivo, por lo que el tiempo deberá de ser entre 40 y 60 minutos. En la mayoría de las zonas de producción se sigue utilizando el riego rodado con gran éxito (seis riegos en total); sin embargo, dependerá del acceso y la disposición de agua de las zonas de producción. (Santoyo & Martínez , 2010)

c. Fertilización

Consiste en la aplicación de sustancias nutritivas (iones minerales, compuestos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, mejoradores, bio activadores, hormonas, ácidos, etc), necesarias para los vegetales, en el agua de riego; aplicándolas en la cantidad, proporción y forma química requerida por las plantas, según su etapa de desarrollo, ritmo de crecimiento y acumulación de materia seca, de tal manera que se logren a corto y largo plazo altos rendimientos, con calidad y mantenimiento de un adecuado nivel de fertilidad general en el suelo.

El cultivo del brócoli es altamente demandante de materia orgánica, de ser posible se deben de adicionar por lo menos 4 t/ha dos meses antes de trasplante; además, este cultivo es altamente demandante de nitrógeno, sobre todo en las etapa de crecimiento. Los fertilizantes que se recomiendan usar son urea, nitrato de potasio, nitrato de magnesio y fosfato monoamónico. (Santoyo & Martínez , 2010)

6. Cosecha

La cosecha se debe realizar cuando la cabeza o inflorescencia principal tiene un tamaño de 5 a 6 pulgadas, con grano fi no y compacto; estos parámetros son tomados en cuenta para la comercialización en el mercado en fresco. Para el mercado de procesamiento, se debe tomar en cuenta el tamaño máximo que pueda alcanzar la inflorescencia, siempre y cuando presente grano de fi no a mediano, sin llegar a reventar el pedicelo (columna) de la flor; el tamaño ideal es de 6 a 8 plg. (Santoyo & Martínez , 2010)

B. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES

Entre las principales enfermedades en el cultivo de brócoli se destaca:

1. Alternaria sp.

a. Taxonomía

Alternaria sp. Es un hongo dematiáceo, perteneciente al orden Pleosporales, familia Pleosporaceae. El género *Alternaria* abarca cientos de especies. La mayoría son saprofitas, encontrándose en el suelo, material en descomposición y aire.

Las especies más frecuentemente aisladas en humanos son: *A. alternata*, *A. chartarum*, *A. dianthicola*, *A. infectoria*, *A. stemphyloides*, *A. tenuissima* y *A. longipes*. (Rivas, 2014)

Tabla 8. 2. *Taxonomía de Alternaria sp*

Clasificación	
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subdivisión:	Pezizomycotina
Clase:	Dothideomycetes
Orden:	Pleosporales
Familia:	Pleosporaceae
Género:	<i>Alternaria</i>
Especies: <i>alternata</i> , <i>brassicae</i> , <i>brassicicola</i>	

Nota. (Rivas, 2014)

b. Descripción morfológica

Los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espóra anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espóra produce más de un brote. (Carrillo, 2003, pág. 81)

El estudio de *Alternaria* en microscópico se puede realizarse sin tinción, observándose hifas septadas dematiáceas, conidióforos septados con pared lisa o rugosa, simples o simpodiales con varios poros de inserción y, conidios únicos o en cadenas acropétalas con forma ovoide u obclavada, septados longitudinalmente y transversalmente. El final del conidio, cerca del conidióforo es redondo, mientras que se estrecha hacia el ápice. Dicha característica les da la apariencia típica a los conidios. (Rivas, 2014)

“Se puede observar macroscópicamente, colonias planas y algodonosas, de coloración blanca grisácea inicialmente y posteriormente se observa su superficie de color café o verde oliva oscuro, el reverso de la colonia es café oscuro a negro, como resultado del depósito de pigmento dihidroxinaftaleno-melanina”. (Rivas, 2014)

c. Sintomatología de *Alternaria sp*.

Causa el marchitamiento de las plantas si ataca cuando ellas son jóvenes. Los ataques en plantas adultas son menos severos, causando manchas en las hojas. (Carrillo, 2003)

Los síntomas de la enfermedad corresponden a lesiones de color café oscuro a negro en las hojas y peciolos, estas caen posteriormente y son fuente inóculo posterior para la diseminación de la enfermedad. (Sepulvéda & Tay, 2011)

d. Ciclo de vida de *Alternaria* sp

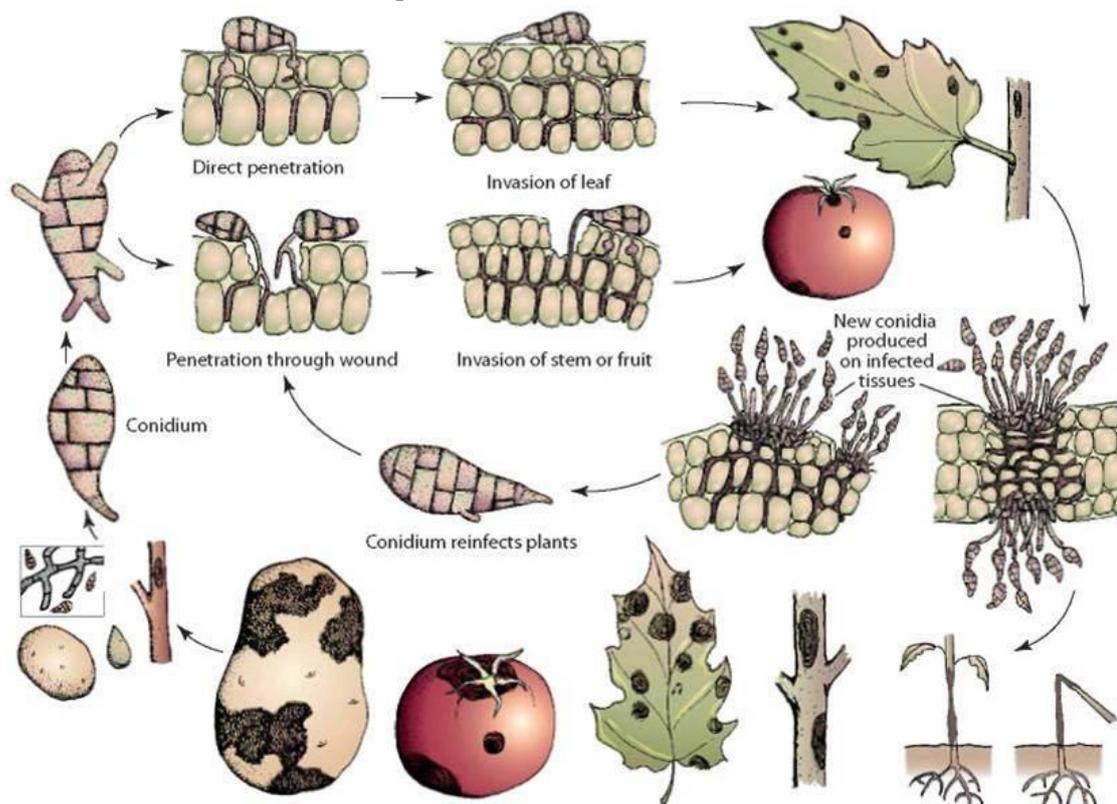


Figura 8. 1. Ciclo de vida de alternaria sp como un patógeno de vegetales.

Nota. (Agrios, 1985)

El ciclo de vida de *Alternaria* sp presenta 4 etapas:

1) Etapa de sobrevivencia del hongo.

Son todos parásitos obligados (Briofitos), por lo general la infección y desarrollo del micelio es totalmente superficial, desarrollando haustorios en los tejidos epidérmicos. Raramente matan a sus huéspedes, pero utilizan sus nutrientes, disminuyen su fotosíntesis, aumentan su respiración, disminuyen su desarrollo y productividad. (Medina, 2014)

Sobreviven como saprófitos en restos de plantas enfermas. Cuando los conidios quedan expuestos a temperaturas bajas (3 °C) se pueden formar clamidosporas y microesclerocios, estructuras con gran capacidad de persistencia en condiciones adversas. (Medina, 2014)

2) Etapa de gemación del hongo.

Cada gema producida tiene la potencialidad de infectar y producir más lesiones en nuevas hojas. La presencia de agua y temperatura alrededor de 18 °C es importante para que esto ocurra. Cuando estas gemas se depositan en hojas débiles o tallos jóvenes; en pocas horas, inicia la germinación de las gemas con la emisión de hifa del hongo sobre el tejido de la planta. (Medina, 2014)

3) Fructificación de nuevas lesiones o inóculo secundario.

Esta fase se debe principalmente al desarrollo de la enfermedad cuando las condiciones climáticas o factores para que el patógeno disperse más la expansión de la enfermedad a la planta. (Medina, 2014)

4) Final del ciclo de la enfermedad e inóculo residual.

Al final de la época lluviosa, la humedad disminuye, la temperatura se incrementa, hay mayor ventilación y menos horas de mojado foliar. Durante el invierno, el hongo permanece en los restos de cosecha que quedan en el suelo. Las plantas más débiles debido a ataques por otras enfermedades o por falta de abonado nitrogenado, son a las que primero ataca. (Medina, 2014)

e. Control químico

El control químico debe ser utilizado como complemento a las medidas culturales descritas como parte de un control biológico. (Sepulvéda & Tay, 2011)

1) Desinfección de semillas

- Cadilac 80 WP (Mancozeb).

2) Aplicaciones Foliare

Las aplicaciones al follaje deben realizarse cuando se observan los primeros síntomas, estos se manifiestan con una clorosis incipiente en los bordes de las hojas. Un estado avanzado de la enfermedad causa lesiones necróticas en los folíolos y pérdida importante de plantas en el campo. (Sepulvéda & Tay, 2011)

Una vez detectada la enfermedad se deben realizar aplicaciones químicas al follaje en con una periodicidad de 10-15 días, utilizando los siguientes productos:

- a) Amistar 50 WG (Azoxystrobin).
- b) AmistarTop (Azoxystrobin/Difenoconazole).
- c) Glider 72 SC (Chlorotalonil).
- d) Bravo 720 (Chlorotalonil).
- e) Chlorotalonil 720 SC (Chlorotalonil).
- f) Balear 720 SC (Chlorotalonil).
- g) Score (Difenoconazole).
- h) Caldera 250 EC (Difenoconazole). (Sepulvéda & Tay, 2011)

f. Control biológico.

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre que pueden ser usados para el control de muchos patógenos, al biosintetizar un amplio rango de metabolitos que actúan sobre los hongos patógenos. También está demostrado que especies de *Trichoderma* inducen respuestas de defensa local y sistémica en cultivos agrícolas tal como algodón, tabaco y lechuga (Reino et al. 2008). Citado por (Vargas, 2009)

Dentro del control biológico Vargas, (2009). Manifiesta que se pueden utilizar extractos de plantas como es el caso de nimbo de la India *Azadirachta indica (neem)* es el mejor ejemplo de una planta usada frecuentemente en muchos países por su actividad antifúngica de amplio espectro utilizada; dicha actividad se le atribuye a las azadirachinas y nimbidinas.

2. *Brevicorine brassicae*, L (Pulgón)

a. Taxonomía

Tabla8. 3. *Clasificación taxonómica de Brevicorine brassicae. L, (pulgón)*

Reino:	Animal
Subreino:	Metazoario
Phyllum:	Artrópoda
Clase:	Insecta
Subclase:	Pteryogenea
Orden:	Hemiptera
Suborden:	Homoptera
Subfamilia:	Aphidina
Familia:	Aphidaceae
Genero:	Brevicoryne
Especie:	Brassicae

Nota. (EcuRed, 2014). Presenta la siguiente clasificación:

b. Descripción morfológica

Son insectos de cuerpo blando pequeño, aspecto globoso y con un tamaño medio entre 1-10 mm. Hay pulgones ápteros (sin alas) y alados. Los primeros tienen el tórax y abdomen unido, y los segundos perfectamente separados. El color puede variar del blanco al negro, pasando por amarillo, verde y pardo”. (INFOAGRO, 2010)

Los pulgones son insectos chupadores, y están provistos de un largo pico articulado que clavan en el vegetal, y por él absorben los jugos de la planta. Segregan un líquido azucarado y pegajoso por el ano denominado melaza, e impregna la superficie de la planta impidiendo el normal desarrollo de ésta. En la zona final del abdomen, se encuentran situados dos tubitos o sifones, de

distinto tamaño y forma según especie, por el cual segregan sustancias ceras. Otras especies, poseen en el abdomen glándulas productoras de cera pulverulenta con la que se recubren, son los pulgones harinosos o laníferos. (INFOAGRO, 2010)

Sin excepción, son insectos chupadores, generalmente de jugos de plantas, aunque a veces se han adaptado a la alimentación de sangre o a chupar los líquidos de presas que cazan. (INFOAGRO, 2010)

c. Síntomas de *Brevicorine brassicae*, L (pulgón)

Los pulgones realizan picaduras en el vegetal, del cual extraen savia, lo que debilita la planta disminuyendo su vigor, y la resistencia tanto al ataque de las mismas plagas como a condiciones externas del ambiente. Las plantas quedan recubiertas de cera. Las hojas se abarquillan, pierden color y pueden llegar a secarse. Además, provoca un daño indirecto al ser un transmisor de virus. (Bermejo, 2011)

d. Ciclo del insecto

El ciclo clásico, es el siguiente:

Primero el pulgón nace de huevos del año anterior, hembras ápteras, partenogenéticas y víparas (fundadoras), que producen.

Segundo, otra serie sucesiva de hembras con otras características (hijas de las fundadoras).

Tercero, en la segunda o tercera generación, aparecen hembras aladas, partenogenéticas y vivíparas (emigrantes), que vuelan en grandes masas para invadir otras plantas de la misma o distinta especie que la de que provienen, pero siguen produciéndose las ápteras como anteriormente.

Cuarto, en las nuevas plantas, las emigrantes siguen produciendo generaciones de hembras (colonizadoras) ápteras y aladas, partenogenéticas y vivíparas, de las cuales las aladas emigran.

Quinto, en las nuevas plantas, se producen otras hembras aladas o ápteras, partenogenéticas y vivíparas que son las sexúparas, ósea las que darán a los individuos sexuales; generalmente las sexúparas aladas vuelven a la planta primitiva.

Sexto; las formas sexuales macho y hembra, ápteros o alados, que se aparean y ponen los huevos que pasan así un tiempo para luego salir de ellos las fundadoras ese ligero esquema del ciclo lleva en realidad bastantes o más complicaciones, y las series de hembras de cada categoría se diferencian unas de otras por caracteres morfológicos precisos, de modo que son formas diversas de la especie. (INFOAGRO, 2010)

e. Control químico

En brasicáceas durante el periodo de crecimiento vegetativo hay que ir muestreando toda la parcela para detectar cuanto antes la presencia del insecto, y así poder tratar por focos antes de que el ataque se extienda y haya que tratar toda la finca.

Una vez la planta empieza a acogollar tratar si se detecta algún pulgón.

Algunas de las materias activas que se utilizan son: cipermetrin, deltametrin, zeta-cipermetrin, imidacloprid, pirimicarb, etofenprox o piretrinas naturales (Bermejo, 2011)

f. Control biológico

Basurto, (2018). Indica que las hojas de molle (*Schinus molle L.*) contienen una resina que posee propiedades insecticidas, fungicidas y repelentes. Se emplea para el control de hormigas, pulgones y polilla de la papa”. Se prepara dejando macerar en agua 100g de hojas y/o frutos por litro 10 de agua durante 10 días” o moliendo y utilizar con talco o como te.

(Martinez, Sanromá, & Rosveti, 2006). Manifiestan que se deben realizar tratamientos con *Verticillium lecanii* (cepa Micotall).

Realizar tratamientos con *Diaretiella rapae* que parasita a *B. brassicae*, observándose individuos de pulgón momificados en el cultivo. (Bermejo, 2011)

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESIDUOS DEL ENDULZADO DE CHOCHO.

En las aguas residuales del endulzado de chocho están presentes los llamados anti nutrientes los cuales son un obstáculo para la alimentación tanto humana como animal por su alto contenido de alcaloides, quinilizidínicos amargos tóxicos la lupanina esparteína, 4-hydroxilupanina y 13-hydroxilupanina son los alcaloides principales del chocho. La esparteína y la lupanina son los alcaloides mas tóxicos, el contenido de aminoácidos totales es de 3-4% en las semillas de chocho. (Carrasco, 2014)

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Grasas y Aceites	PEE/LABCESTTA/42 Standard Methods No. 5520 B	mg/L	<2	±30%	-
Aluminio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,05	±10%	-
Arsénico	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,01	±22%	-
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,07	±17%	-
Berilio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,006	±21%	-
Boro	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	0,064	±20%	-
Cadmio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,0008	±22%	-
*Cobalto	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,01	-	-
Cobre	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<0,006	±20%	-
Fosforo	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 ICP-AES Rev 4.4 1994	mg/L	<1,7	±23%	-

Figura 8 2. Análisis del agua residual del chocho. Fuente. (CESTTA, 2016)

Amino acido	Crudo	Cocido y desamargado con agua	Desamargado con alcohol	FAO Patrón
Isoleucina	4.8	5.5	5.0	4.0
Leucina	7.0	7.9	7.9	7.0
Lisina	5.9	5.6	6.4	5.5
Metionina/Cisteina	1.6	1.9	2.4	3.5
Feenylalanina/Tirosina	7.9	8.1	6.3	6.0
Treonina	3.8	3.6	4.2	4.0
Triptofano	0.7	0.7	0.6	1.0
Valina	4.2	4.5	4.5	5.0

Figura 8 3. Contenido de amino ácidos esenciales en el tarwi crudo, desamargado con agua y con alcohol (g amino acid/16g N) (Carrasco, 2014)

Alcaloides	Porcentaje %
Lupanina	60
13-Hidroxlupanina	15
Esparteína	7,5
4-Hidroxlupanina	9
Isolupanina	3

Figura 8.4 principales fracciones de alcaloides del chocho, fuente: (Jarrin, 2003)

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

1. Localización

Se realizó en el laboratorio de Ciencias Biológicas en el departamento de microbiología, de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH, ubicado en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

2. Ubicación geográfica

- a. Latitud: 1°38'51"S
- b. Longitud: 78°40'58"O
- c. Altitud: 2820 m.s.n.m (Estación meteorológica ESPOCH, 2018)

3. Condiciones de laboratorio

- a. Temperatura promedio: 22° C.
- b. Humedad relativa: 50 a 55 %. (datos tomados del hidrotermómetro del laboratorio de ciencias biológicas, 2018)

B. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Materiales

- a. Papel toalla.
- b. Portaobjetos y cubreobjetos.
- c. Cajas mono Petri desechables.
- d. Guantes quirúrgicos.
- e. Papel filtro.
- f. Aguja de tuxteno.
- g. Tarrinas plásticas.
- h. Cinta.
- i. Fosforera.
- j. Marcador permanente.
- k. Frascos de vidrio de 500 ml.
- l. Micropipeta automática 100 uL
- m. Embudos.
- n. Piceta
- o. Gas.
- p. Mechero.
- q. Sacabocados.
- r. Goteros.
- s. Computador.
- t. Marcadores.
- u. Esferos.
- v. Calculadora.

- w. Grapadora.
- x. Perforadora.
- y. Libreta de campo.

2. **Equipos.**

- a. Autoclave.
- b. Microscopio.
- c. Cámara de aislamiento de flujo laminar.
- d. Cámara microscópica digital (10 mp).
- e. Incubadora.
- f. Refrigeradora.

3. **Reactivos.**

- a. Medio de cultivo-PDA.
- b. Cloranfenicol.
- c. Alcohol industrial.
- d. Agua destilada.
- e. Fungicida.

C. **MÉTODOS**

1. **Metodología**

a. Fase de campo

- 1) Las muestras del residuo de endulzado de chocho se obtuvo por parte de Maquita Cushunchi Chimborazo, MCCH quienes recolectaron los residuos líquidos del proceso de cocción del chocho de la planta de procesamiento en la parroquia Chugchilan. La recolección se realizó el mismo día que fue trasladado a la ciudad de Riobamba, en condiciones controladas de temperatura.
- 2) Se realizó la recolección de muestras infestadas con *Alternaria* sp. En hojas de brócoli.

Se realizó la recolección de muestras infestadas a partir de hojas de brócoli que muestren una alta incidencia del patógeno, provenientes de campos de cultivos pertenecientes a socios de la planta de endulzamiento de la Parroquia Chugchilan, Cantón Latacunga, Provincia Cotopaxi.

b. Fase de laboratorio

- 1) Aislamiento del patógeno *Alternaria* sp.

Se realizó cámara húmeda a las muestras recolectadas en campo utilizando el siguiente protocolo:

- a) Se realizó un triple lavado:

Se lavó las muestras en agua corriente, luego se sumergió las muestras en una solución de alcohol al 2% por un minuto, lavar las muestras con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, después de cada lavado las muestras se las enjuaga con agua destilada estéril haciendo uso de una piceta, las muestras se dejó en una caja Petri con papel filtro previamente humedecido durante tres días en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente ± 20 °C.

- 2) Identificación morfológica de *Alternaria* sp.

La identificación morfológica se realizó observando las estructuras características de *Alternaria* bajo el microscopio comparando con la clave de identificación según (Ellis, 1976)

- 3) Inoculación del hongo *Alternaria* sp.

- a) Preparación de Agar Papa Dextrosa (PDA).

Se pesó 20 g. de PDA también se añadió 500 mg de cloranfenicol para 500 ml de agua destilada. Se esterilizó el medio de cultivo utilizando el autoclave, a una temperatura de 126°C durante 20 minutos, luego se procede a esperar a que el medio de cultivo se enfrié a una temperatura aproximada de 50 °C para verter en las cajas Petri.

- b) Con la aguja de tungsteno se transfirió parte del micelio del hongo al medio de cultivo.

- 4) Purificación del cultivo.

Una vez verificado que el patógeno colonizó el medio de cultivo, se realizó replicas para obtener una cantidad suficiente de inóculo para realizar las posteriores pruebas.

- 5) Pruebas de antagonismo.

Para realizar las pruebas de antagonismo en medio sintético (PDA) se utilizó la siguiente metodología:

- a) Medición del pH de los extractos, los cuales deben estar ajustados a un valor de 6.
 b) Formulación de PDA en el extracto líquido: En función de las concentraciones a evaluarse (25%, 50% y 75%) se trabajará con la formulación de PDA con los extractos en lugar de H₂O_d, (agua destilada) es decir para 500 ml de PDA:
- i. Al 25% se utilizaron 25 ml de extracto y 75 ml de H₂O_d
 - ii. Al 50% se utilizaron 50 ml de extracto y 50 ml de H₂O_d
 - iii. Al 75% se utilizaron 75 ml de extracto y 25 ml de H₂O_d

Se realizó de la siguiente manera:

Con el extracto o residuo del endulzado de chocho añadido antes de la esterilización (cuando el PDA este a 50 °C) con la adición del antibiótico previo esterilización).

Para el control absoluto solo se utilizó PDA formulado de forma normal.

Para el control químico se utilizó PDA formulado más la dosis recomendada por la casa comercial.

Nota: Los cálculos se realizaron de acuerdo a la cantidad de extracto, número de cajas y cantidad de colonias inoculadas.

Se realizó el vertido en las cajas Petri.

Al día siguiente se realizó la siembra de discos de 4 mm extraídos con el sacabocados N°4 al centro de la placa y se evaluó el crecimiento de diámetro micelial cada 24 horas. Además se debe tener extracto estéril, H₂O_a, papel filtro y goteros (micropipeta automática 100 uL) estéril para realizar las pruebas de patogenicidad en fragmentos de hojas de brócoli.

6) Preparación de la suspensión de esporas.

Al raspado del cultivo in vitro, que estaba en las cajas Petri, se le añadió 10 ml de agua destilada en condiciones estériles; luego, la suspensión se homogenizó, se filtró con una gasa y se colocó en viales estériles. Finalmente, se llevó la suspensión a la cámara de Neubauer para el conteo. (Rinel, 2016)

Con los ajustes respectivos en función de las condiciones del laboratorio se obtuvo la solución para la inoculación en tejido vegetal sano.

7) Evaluación del desarrollo del hongo.

El efecto de los residuos del endulzado de chocho sobre *Alternaria* sp. Se evaluó mediante el método del envenenamiento del medio de cultivo agregándole los residuos diluidos donde se obtuvo las concentraciones correspondientes a 25 %, 50 % y 75 %, utilizando el medio como diluyente aún en estado líquido. Cada medio (20 ml) se vertió en placas Petri estériles de 12 cm de diámetro (Rinel, 2016)

El medio de cultivo para el crecimiento del hongo (*Alternaria* sp.) contiene papa-dextrosa-agar (PDA) + ácido láctico (25%) (Calvo, 2012).

Finalmente la inoculación de los fitopatógenos se realizó en el centro de cada placa, donde se colocó 100µl de la suspensión conidial (107/ml por superficie) en un radio de 5 mm y se incubó a 25°C. (Rinel, 2016)

Los testigos solo contienen el medio de cultivo sin adición de los residuos del endulzado de chocho, para el testigo químico se colocó la dosis de la casa comercial.

Para calcular el porcentaje de inhibición del desarrollo de *Alternaria* sp, se utilizó la siguiente fórmula (Rinel, 2016)

$$\text{Inhibición micelial \%} = \frac{dc - dt}{! dc} \times 100$$

Donde:

- dc = diámetro del micelio del control en mm

• dt = diámetro del micelio del tratamiento en mm

Se procedió a evaluar cada 24 horas y durante 144 horas, midiendo en ocho orientaciones porque estos patógenos se desarrollan radialmente.

Para la velocidad de crecimiento micelial se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento} \frac{\text{mm}}{\text{día}} = \frac{\text{diámetro final} - \text{diámetro inicial} \times 2}{2 \text{ tiempo transcurrido!}}$$

8) Pruebas de patogenicidad en fragmentos de hojas de brócoli.

Se colectó hojas sanas de brócoli y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto, seguido de un lavado en agua esterilizada para eliminar los restos de hipoclorito de sodio; posteriormente, se dejó los fragmentos de hojas de brócoli desinfectados sobre papel filtro estéril; luego, se colocó dentro de las cajas Petri sobre papel filtro húmedo. (Rinel, 2016)

Se sumergió los fragmentos de hojas a las siguientes concentraciones (25 %, 50 % y 75 %). La inoculación se realizó con la suspensión de conidios. En cada tratamiento se aplicó una dosis de 100 µl de suspensión con una concentración de 107 conidios/ml-1 en la parte central del haz de la hojas; finalmente, se sellaron las placas Petri y se incubó a 25°C C (Rinel, 2016). Para los testigos no se colocó residuos de endulzado de chocho y para el testigo químico se realizó la inmersión del fragmento de hoja en la dosis recomendada por la casa comercial con el fungicida selectivo para *Alternaria* sp.

La incidencia de la *Alternaria* sp se evaluó a los 96 horas; para ello se utilizó la escala de valores en porcentaje de área afectada según Goidanich 1959, citado por (Rinel, 2016).

La severidad de *Alternaria* sp se evaluó a los 7 días utilizando la escala diagramática de daño de 6 clases en base a la cantidad de tejido de hoja afectado por el Fito patógeno.

Tabla 9. 4. Escala de daño de la enfermedad *Alternaria* sp

Escala	Descripción
0	No hay enfermedad en la hoja
1	Mancha concéntrica pequeña que cubre <1% del área foliar
3	Manchas concéntricas que cubre del 1-10% del área foliar
5	Manchas concéntricas que cubre del 11-25% área foliar
7	Manchas concéntricas que cubre del 26-50% área foliar
9	Manchas concéntricas >50% del área foliar

Nota. Escala adaptada para *Alternaria* sp. (Sharma, 2014)

9) Efecto de los residuos del endulzado de chocho sobre pulgones.

a) Captura de pulgones

La captura de pulgones se realizó de campos de cultivos de brócoli infestados con *Brevicoryne brassicae*, L, el pulgón de las crucíferas, los cuales se colectaron en tarrinas las mismas a las que se les proporciono humedad colocando papel filtro humedecido al fondo.

i. Colecta de hojas

Se colectó hojas sanas de brócoli de campos de cultivo libres de plagas, enfermedades y si es posible libres de químicos, las hojas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto, seguido de un lavado en agua esterilizada para eliminar los restos de hipoclorito de sodio; posteriormente, se dejó los fragmentos de hojas de brócoli desinfectados sobre papel filtro estéril; luego, se colocó dentro de las cajas Petri sobre papel filtro húmedo

b) Pruebas sobre pulgones

Bioensayos:

Se determinó la repelencia y la tasa de mortalidad de pulgones utilizando la siguiente metodología:

Para la evaluación del residuo del endulzado de chocho, se utilizó el método propuesto por Abou-Setta & Childers (1987) y citado por (Cerna, 2009) , este bioensayo es llamado por película residual que consistió en tomar un recuadro de 4 por 4 cm de hoja de brócoli libre de entomopatogenos y plaguicidas.

Metodología modificada de (Lara-Sánchez, González-Hernández, & Hernández-Juárez, 2013). Con las mismas concentraciones, se realizó el método de película residual, para esto se sumergió un fragmento de hoja de brócoli en cada concentración y se procedió a frotar el fragmento de hoja en el fondo de los vasos de precipitación con 20 ml de agua destilada añadiendo las concentraciones de (25%, 50% y 75%).

Metodología modificada de (Cerna, 2009) Para ello se colocó al azar 30 insectos por caja Petri, con un buen manejo para evitar mortalidad de los insectos por daño mecánico, utilizando la técnica de Abou-Setta y Childers (1987) conocida como hoja de arena, que consiste en la transferencia de pulgones sobre el fragmento de hoja de brócoli, mediante un pincel de pelo de camello a las cajas Posteriormente se conservó bajo condiciones normales de ambiente, con una temperatura aproximada de 25-30°C, una humedad relativa entre 55 y 70 %. Ahí permaneció en observación hasta que todos los pulgones fueron afectados por muerte o repelencia.

D. ESPECIFICACIONES DEL EXPERIMENTO

1. Número de Cajas Petri:

La unidad experimental estuvo determinada por cada caja Petri de 90 mm * 15 mm y 20 ml de PDA.

Para *Alternaria* sp.

- 1) 9 cajas Petri para *Alternaria* sp. (PDA + Extracto), en medio esterilizado.
- 2) 3 cajas Petri para control absoluto.
- 3) 3 cajas Petri para control químico.

a. Para *Brevicorine brasicae*. L, (pulgón)

- 1) 9 cajas Petri para *Brevicorine brasicae*. L, (pulgón)
- 2) 3 cajas Petri de control químico.

2. Tratamientos en estudio

a. *Alternaria* sp. y *Brevicorine brasicae*. L, (pulgón)

Concentraciones: 3

Número de repeticiones : 3

Testigo Absoluto: 1

Testigo químico: 1

Número de unidades experimentales; 15

Para el caso del ensayo realizado en pulgones se eliminó el testigo absoluto teniendo 12 unidades experimentales.

Cabe mencionar que cada una de las concentraciones se consideró como un tratamiento. El detalle de los mismos puede revisarse en la tabla. 5.

Tabla 9. 5. *Tratamientos en estudio.*

Código	Descripción
T1	Control absoluto (PDA simple)
T2	Control químico *
T3	Residuo del endulzado de chocho al 25 %
T4	Residuo del endulzado de chocho al 50 %
T5	Residuo del endulzado de chocho al 75 %

Nota: * Para el control químico de *Alternaria* sp .se utilizó Difenconazol (Score) en dosis de 1cc/lit y para *Brevicorine brasicae*. L, (pulgón), se utilizó (cipermetrina) en dosis de 1,5 cc/lit. Elaborado por. Ortuño, (2019)

E. TIPO DE DISEÑO

1. Características del diseño

Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), con tres tratamientos, más un testigo químico y un testigo absoluto con tres repeticiones.

2. Esquema de análisis de varianza

a. Análisis de varianza

Tabla 9. 6. Análisis de Varianza (ADEVA) para *Alternaria* sp.

Fuente de variación	Formula	gl
Tratamientos	T-1	4
Error	T (R-1)	10
Total	(T*R)-1	14

Nota: Elaborada por. (Ortuño. 2019)

Tabla9. 7. Análisis de Varianza (ADEVA) para *Brevicorine basicase*. L, (pulgón),

Fuente de variación	Formula	gl
Tratamientos	T-1	3
Error	T (R-1)	8
Total	(T*R)-1	11

Nota: Elaborada por. (Ortuño. 2019)

3. Análisis funcional

Se realizó la prueba de TUKEY al 5% cuando a los resultados que dieron una respuesta significativa entre tratamientos, además se determinó el coeficiente de variación.

F. VARIABLES EN ESTUDIO.

1. *Alternaria* sp

- a. Pruebas de antagonismo en medio sintético formulado con las concentraciones del residuo del endulzado de chocho.

Se inoculó el patógeno en el medio formulado con cada una de las concentraciones, se evaluó cada 24 horas a partir de la inoculación hasta que el crecimiento de cualquier tratamiento alcance el diámetro total de la caja Petri. Los datos se registraron en una base de datos en Excel.

- 1) Taza de crecimiento e inhibición micelial del hongo en medio sintético (PDA) más las concentraciones del residuo del endulzado de chocho.

El crecimiento del micelio del hongo en medio sintético (PDA) se midió en centímetros (cm), iniciando la medida a partir del inóculo (centro de la placa) hasta el borde de ésta (diámetro de la caja Petri 90mm), la medición se realizó cada 24 horas, hasta que no se observaron diferencias en el crecimiento.

Para calcular el porcentaje de inhibición del desarrollo de *Alternaria* sp, se utilizó la siguiente fórmula (Rinel, 2016)

$$\text{Inhibición micelial \%} = \frac{dc-dt}{!dc} \times 100$$

Donde:

- dc = diámetro del micelio del control en mm
- dt = diámetro del micelio del tratamiento en mm

La evaluación se realizó cada 24 horas y durante 144 horas, midiendo en ocho orientaciones porque estos patógenos se desarrollan radialmente.

2) Número de esporas producidas.

El conteo se realizó utilizando la Cámara de Neubauer utilizando la siguiente metodología

En teoría se deberían contar los 4 cuadrantes (64cuadros) marcados con L que equivalen a un volumen de $4 \times 0.1\text{mm}^3$, ya que el volumen de cada cuadrante es: $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$. En la práctica contamos un único cuadrante (16 cuadrados), pero para homogeneizar el recuento escogemos las cuatro diagonales de cada cuadrante L que equivalen a 0.1 mm^3 . Como carecemos de tiempo podemos contar una diagonal y multiplicar el resultado por 4. De los cuadraditos pequeños, contamos las células que caigan dentro de las líneas, en dos de ellas a libre elección, siempre y cuando sean las mismas en todos los cuadrados. (Moreno, 2014)

Cálculo del n° de células totales por ml de suspensión:

$$\text{Numero de conidios} = \frac{R}{16} \times \frac{400}{0,1\text{mm}^3} \times \frac{1000\text{mm}^3}{1 \text{ ml}} \quad \text{ml}$$

DONDE:

R: es el recuento en la cámara

16 es el número de cuadros contados

400: cuadrados de la cámara de Neubauer

1000 es para cambiar de unidades de $0,1 \text{ mm}^3$

Utilizando la siguiente metodología se procede a realizar el conteo de las esporas producidas de los 5 tratamientos con sus respectivas repeticiones una vez que todos los tratamientos estén esporulados.

3) Apariencia de la colonia.

En las cajas Petri se observó directamente las características de las colonias, determinando la forma, margen, elevación y color. Utilizando la guía de identificación morfológica de colonias. (Gil, 2015)

b. Pruebas en tejido vegetal sano (fragmentos de hojas de brócoli).

Se preparó la suspensión de esporas con una concentración de 1×10^5 , se inoculó 10 ul de las distintas concentraciones sobre un fragmento de tejido vegetal de brócoli los cuales se los sumergió en las distintas concentraciones.

1) Incidencia en fragmentos de hojas de brócoli.

Para la incidencia se evaluó la presencia del patógeno en el fragmento de las hojas de brócoli.

2) Severidad en fragmentos de hojas de brócoli.

La severidad se determinó utilizando la escala diagramática de daño de 6 clases en base a la cantidad de tejido de hoja afectado por el Fito patógeno.

2. *Brevicorine brassicae*. L, (pulgón),

a. Porcentaje de repelencia

De los 30 pulgones por tratamiento se avalúo las tres primeras horas los que se alejaron de los fragmentos de las hojas de brócoli impregnadas con los residuos del endulzado de chocho y el testigo químico.

b. Tasa de mortalidad.

De los 30 pulgones por tratamiento se avalúo aquellos muertos sobre los fragmento de las hojas de brócoli, dato expresado en porcentaje.

X. RESULTADOS

A. Alternaria sp

1. Pruebas de antagonismo en medio sintético

- a. Tasa de crecimiento micelial del hongo en medio sintético con las concentraciones del endulzado de chocho.

El análisis de varianza para la variable crecimiento micelial de *Alternaria sp* muestra una respuesta altamente significativas entre los tratamientos, con un coeficiente de variación de 2,14 %.

Tabla 10. 8. *Análisis de varianza para la tasa de crecimiento micelial de Alternaria sp.*

F.V.	SC	gl	CM	F	Significancia
TRATAMIENTOS	63,06	4	15,76	1439,92	**
REPETICIONES	0,02	2	0,01	0,78	ns
Error	0,09	8	0,01		
Total	63,16	14			

Nota. Elaborado por: (Ortuño, 2019)

** : Altamente significativo

ns: no significativo

En la Figura,10.4 se observó la respuesta para la variable tasa de crecimiento micelial de *Alternaria sp*, se observó que el tratamiento residuo del endulzado de chocho al 75% (T5) presento el valor más bajo con una media aritmética de 4.78 mm/día, para el caso del testigo químico se obtuvo una media de 0.36mm/día, mientras que el tratamiento residuo del endulzado del chocho al 25% (T3) con una media de 5,3 mm/día es el de mayor velocidad de crecimiento acercándose al valor obtenido por el testigo absoluto que es de 6,22 mm/día, cabe mencionar que los tratamientos están compuestos por los residuos del endulzado del chocho, lo que representa una alternativa amigable para el ambiente así como para los agricultores y consumidores reduciéndose el riesgo en su manipulación, frente a los eventuales problemas que presenta el uso de productos de síntesis química.

El extracto acuoso de semillas *Lupinus mutabilis* presenta actividad antifúngica frente al crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos: como *Alternaria solani*. (Lara, 2009).

El extracto del agua de cocción contiene 2,5 % de lupanina y 0,32 % de esparteína. Las concentraciones más bajas de alcaloides no tienen efecto anti fúngico (Rodríguez, 2009),

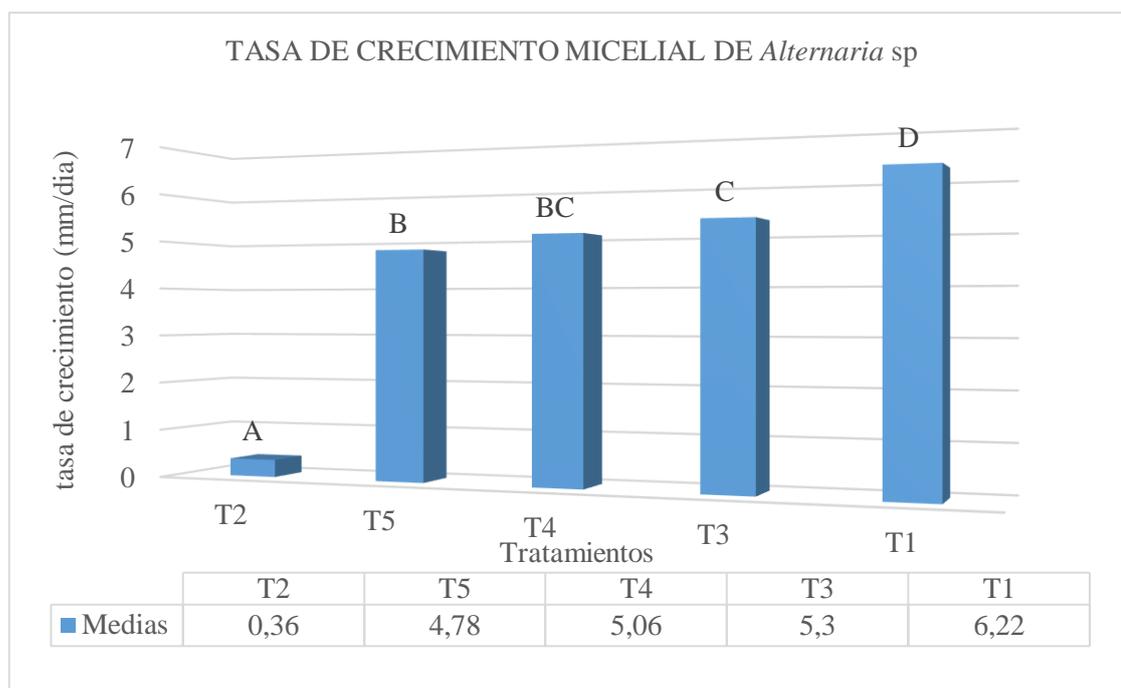


Figura 10. 5. Tasa de crecimiento micelial de *Alternaria* sp en medio sintético.
Nota. Elaborado por: (Ortuño, 2019)

b. Porcentaje de inhibición micelial.

El análisis de varianza para la variable porcentaje de inhibición micelial en *Alternaria* sp, se observó la una diferencias altamente significativas para los tratamientos con un coeficiente de variación de 7,41 %.

Tabla 10. 9. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición micelial en *Alternaria* sp.

F.V.	SC	gl	CM	F	Significancia
TRATAMIENTOS	11067,82	4	2766,95	904,57	**
REPETICIONES	14,75	2	7,37	2,41	ns
Error	24,47	8	3,06		
Total	11107,04	14			

Nota. Elaborado por: (Ortuño, 2019)

**: Altamente significativo

ns: no significativo

En la Figura, 10.5 se observó la respuesta para la variable porcentaje de inhibición micelial de *Alternaria* sp, donde se obtuvo que el tratamiento residuo del endulzado del chocho al 75% (T5) alcanza un porcentaje de inhibición micelial de hasta el 25,45 %, valor superior al determinado por (Lara, 2009) donde manifiesta que la inhibición micelial en concentración del 13% inhibe un 14,66%. Lo que determina que el T5 se puede utilizar como una alternativa de manejo de *Alternaria* sp, en el cultivo de brócoli manteniendo un equilibrio y sin afectaciones al rendimiento, presentando el valor más alto de inhibición. Para el caso del testigo químico se obtuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del 75,36% mientras que el residuo del endulzado del chocho al 50% (T4) con una media de 7,59 % es el de menor porcentaje de inhibición micelial, mientras que el testigo absoluto no presenta inhibición en el crecimiento micelial debido a las condiciones proporcionadas en laboratorio, cabe mencionar que se presume que a mayor concentración el porcentaje de inhibición se incrementa.

Lara, (2009). Manifiesta que de los extractos acuosos o de cocción las moléculas pueden interferir en la actividad fúngica ya que existe gran variabilidad de estas, mientras que para una solución pura los alcaloides ejercen mayor control.

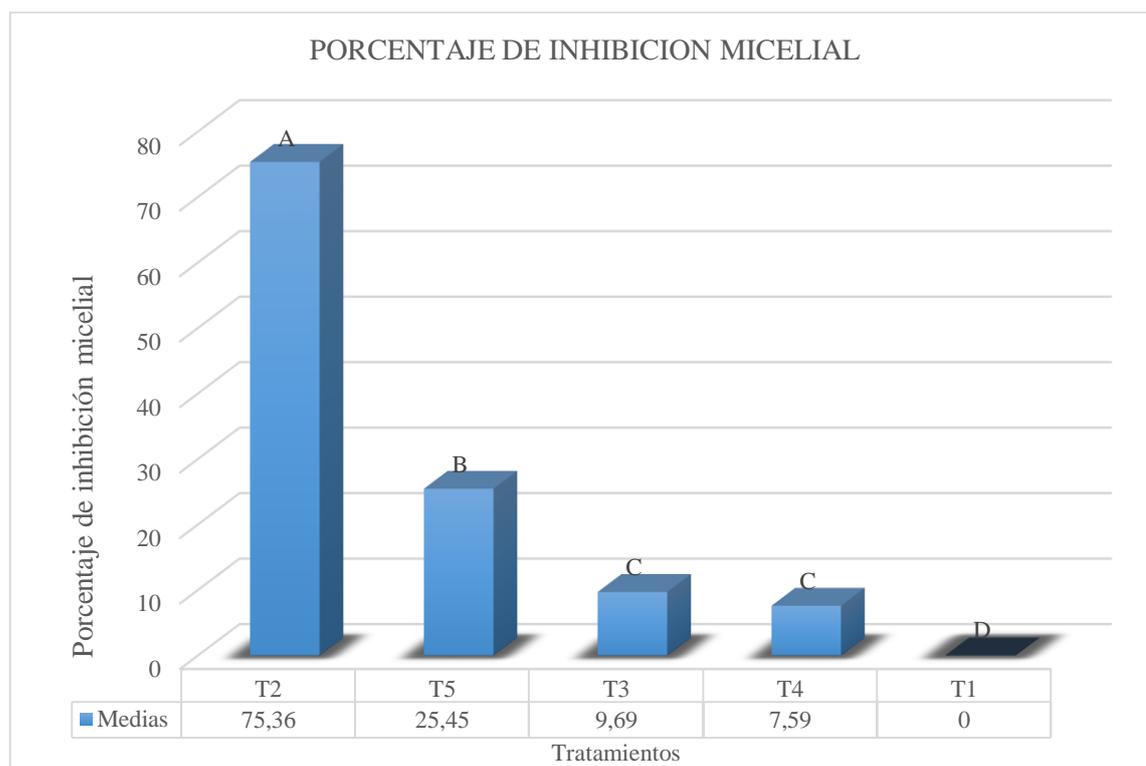


Figura 10. 6. Porcentaje de inhibición micelial de *Alternaria* sp.
Nota: Elaborado por. (Ortuño. 2019)

2. Número de esporas producidas.

Para la variable número de esporas, en los tratamientos se realizó el conteo a los 12 días después de haber inoculado *Alternaria* en medio sintético, sin obtener respuesta en ninguno de los tratamientos, posteriormente se realizó el conteo a los 15 días de haber realizado la inoculación, sin obtener resultados en ninguno de los tratamientos, finalmente se realizó el conteo a los 20 días después de haber realizado la inoculación, de acuerdo a los registros se nota que al no haber esporulación es probable que los extractos inhiban la esporulación, ya que se observó que el tratamiento absoluto T1 presenta una media de 108 esporas en una suspensión de $2,7 \times 10^5$ conidios /ml.

3. Apariencia de la colonia.

Los resultados obtenidos en las variables características morfológicas, presentaron una frecuencia del 100% en todos los tratamientos obteniendo: una coloración verde salvia, forma irregular, elevación umbonada y un borde ondulado.

Las colonias son de color marrón, gris o de color humo a verde oliva, (Calvo, 2012)

4. Pruebas de antagonismo en tejido vegetal sano.

a. Incidencia de *Alternaria sp* en fragmentos de hojas de brócoli

Para los tratamientos que presentaron incidencia para el caso de *Alternaria sp* se realizó la medición del grado de severidad.

b. Grado de severidad de *Alternaria sp* en fragmentos de hojas de brócoli.

El análisis de varianza para la variable grado de severidad de *Alternaria sp* en tejido vegetal de brócoli se observó diferencias altamente significativas con un coeficiente de variación de 11,58 %.

Tabla 10.10. Grado de severidad de *Alternaria sp* en fragmentos de hojas de brócoli.

F.V.	SC	Gl	CM	F	Significancia
TRATAMIENTOS	329,43	4	82,36	53,09	**
REPETICIONES	0,29	2	0,14	0,09	ns
Error	12,41	8	1,55		
Total	342,13	14			
CV	11,58				

Nota. Elaborado por: (Ortuño. 2019)

** : Altamente significativo

ns: no significativo

En la Figura, 10.7 se observa la respuesta para la variable porcentaje de severidad de *Alternaria sp*, en tejido vegetal de brócoli, se observó que con el tratamiento residuo del chocho al 75% (T5) se obtiene una media aritmética de 6,89% presentando el valor más bajo de severidad de *Alternaria sp* sobre tejido vegetal de brócoli, compartiendo rango con el testigo químico, en

relación al tratamiento residuo del chocho al 25% (T3) que presenta el valor más alto de severidad en tejido vegetal sano con una media de 13,89%, considerando que el testigo absoluto alcanzó una media de 18,22% y el testigo químico una media de 5,56%. Cabe mencionar que si consideramos que el testigo químico obtuvo un porcentaje de severidad de 5,56% y el tratamiento residuo del chocho al 75% (T5) un valor de 6,89%, la diferencia no es elevada, por lo podemos asumir que existe un nivel alto de eficiencia en tejido vegetal.

No se han encontrado trabajos similares con el uso del residuo del endulzado de chocho motivo por el cual no se pudo realizar comparaciones.

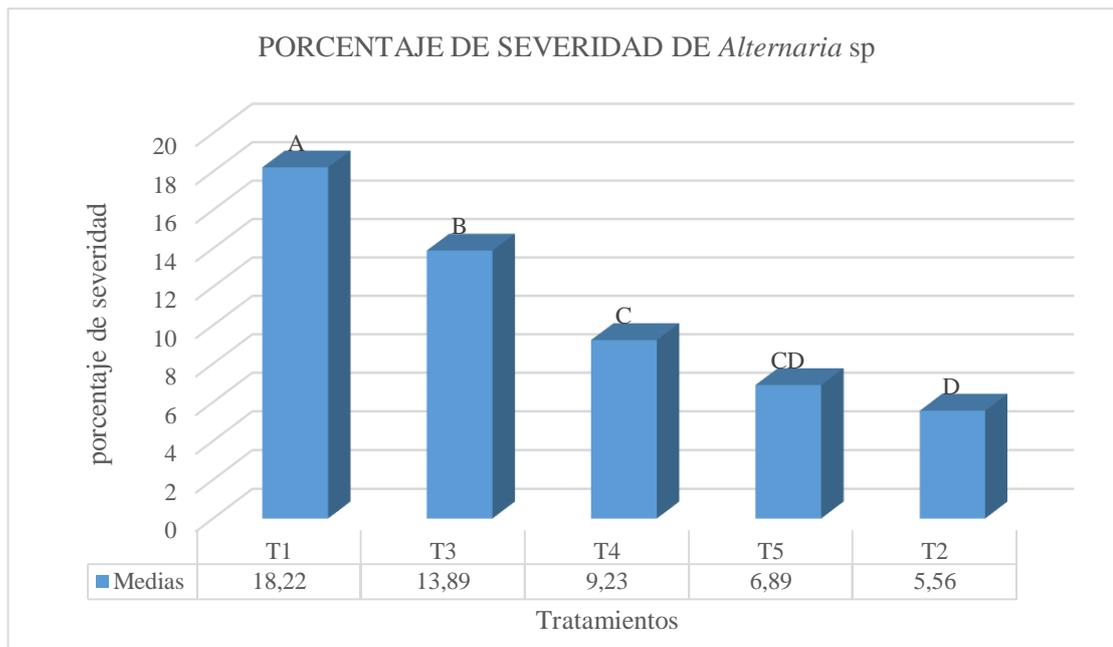


Figura10.7. Porcentaje de severidad de *Alternaria* sp en fragmentos de hojas de brócoli.
Elaborado por: (Ortuño. 2019)

B. PULGONES

A. Porcentaje de repelencia.

El análisis de varianza para la variable porcentaje de repelencia *Brevicorine brassicae*, L. (pulgón). Se observa diferencias significativas entre tratamientos con un coeficiente de variación de 29,28 %.

Tabla 10.11. *Análisis de variancia para el porcentaje de repelencia Brevicorine brassicae*, L. (pulgón).

F.V.	SC	gl	CM	F	Significancia
TRATAMIENTOS	1771,08	3	590,36	8,28	*
REPETICIONES	79,85	2	39,93	0,56	ns
Error	427,97	6	71,33		
Total	2278,9	11			

Nota. Elaborado por: (Ortuño. 2019)

**: Altamente significativo

ns: no significativo

En la Figura, 10.8 se observa la respuesta para la variable porcentaje de repelencia *Brevicorine brassicae*, L.(pulgón) obteniendo en el tratamiento residuo del endulzado del chocho al 75% (T4) una media aritmética de 25,93% presentando el valor más alto de repelencia en relación al tratamiento residuo del endulzado del chocho al 25% (T2) que presenta el valor más bajo de repelencia de pulgones con una media de 19,27%, considerando que el testigo químico alcanzo una media de 49,45% Cabe mencionar que con la utilización del tratamiento residuo del endulzado del chocho al 75% (T4) se lograra reducir en un 25,93% la población de pulgones por repelencia.

Se ha reportado anteriormente por (Bermudes & Torres, 2008) la actividad insecticida del extracto de *Lupinus.stipulatus* actuando como repelente.

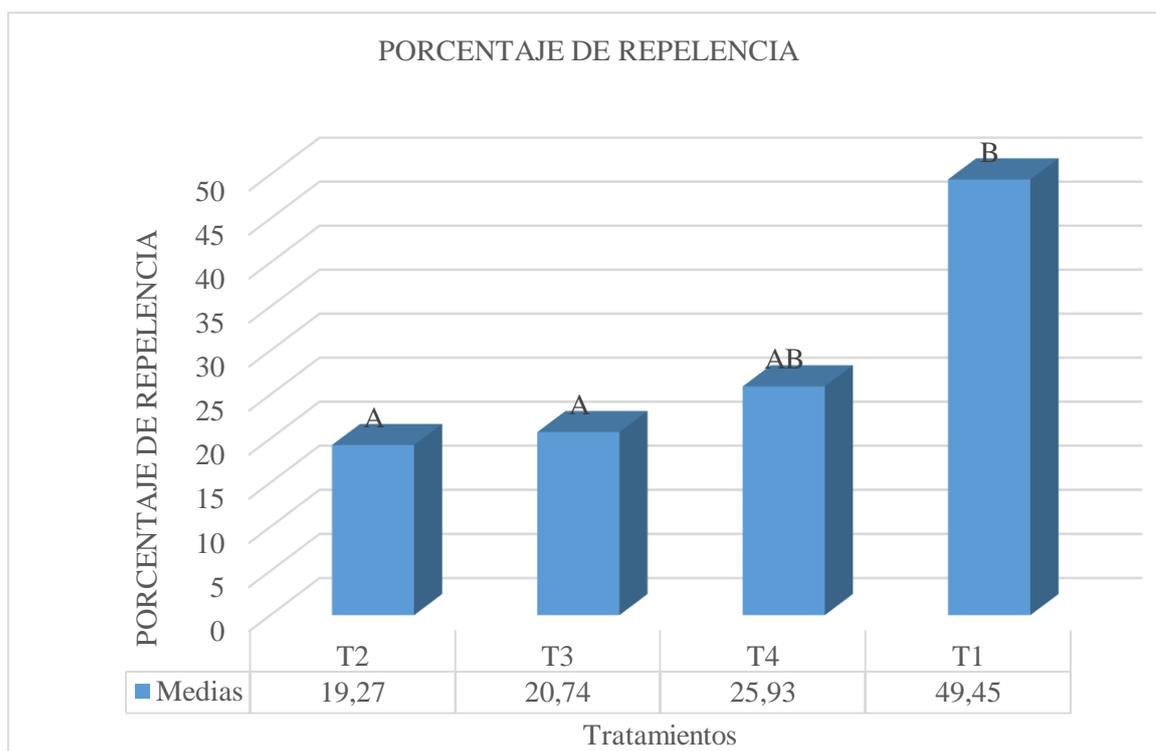


Figura 10.8. Porcentaje de repelencia de *Brevicorine brasicae*, L. (pulgón)
Nota: Elaborado por. (Ortuño. 2019).

B. Tasa de mortalidad.

El análisis de varianza para la variable tasa de mortalidad en pulgones. *Brevicorine brasicae*, L. (pulgón) Se observa diferencias altamente significativas con un coeficiente de variación de 28,36.

Tabla 10.12. Análisis de varianza para la tasa de mortalidad de pulgones *Brevicorine brasicae*, L. (pulgón)

F.V.	SC	gl	CM	F	Significancia
TRATAMIENTOS	1537,69	3	512,56	6,72	*
REPETICIONES	85,54	2	42,77	0,56	ns
Error	457,56	6	76,26		
Total	2080,79	11			

Nota. Elaborado por: (Ortuño. 2019).

** : Altamente significativo

ns: no significativo

En la Figura, 10.9 se observa la respuesta para la variable tasa de mortalidad de pulgones (*Brevicorine brasicae*, L.) se obtuvo que con el tratamiento residuo del chocho al 75% (T4) se obtiene una media aritmética de 32,5% presentando el valor más alto de mortalidad en relación al tratamiento residuo del chocho al 25% (T2) que presenta la tasa de mortalidad más baja de pulgones con una media de 20,28%, considerando que el testigo químico alcanzo una media de

50, 55% Cabe mencionar que con la utilización del tratamiento residuo del chocho al 75% (T4) se lograra reducir en un 32,5% la población de pulgones por ingesta.

La utilización de macerados de las hojas, tallos, raíces y frutos de tarwi silvestre que en combinación con jabón de azufre controla pulgones en 5 aplicaciones. (FAO, 2010)

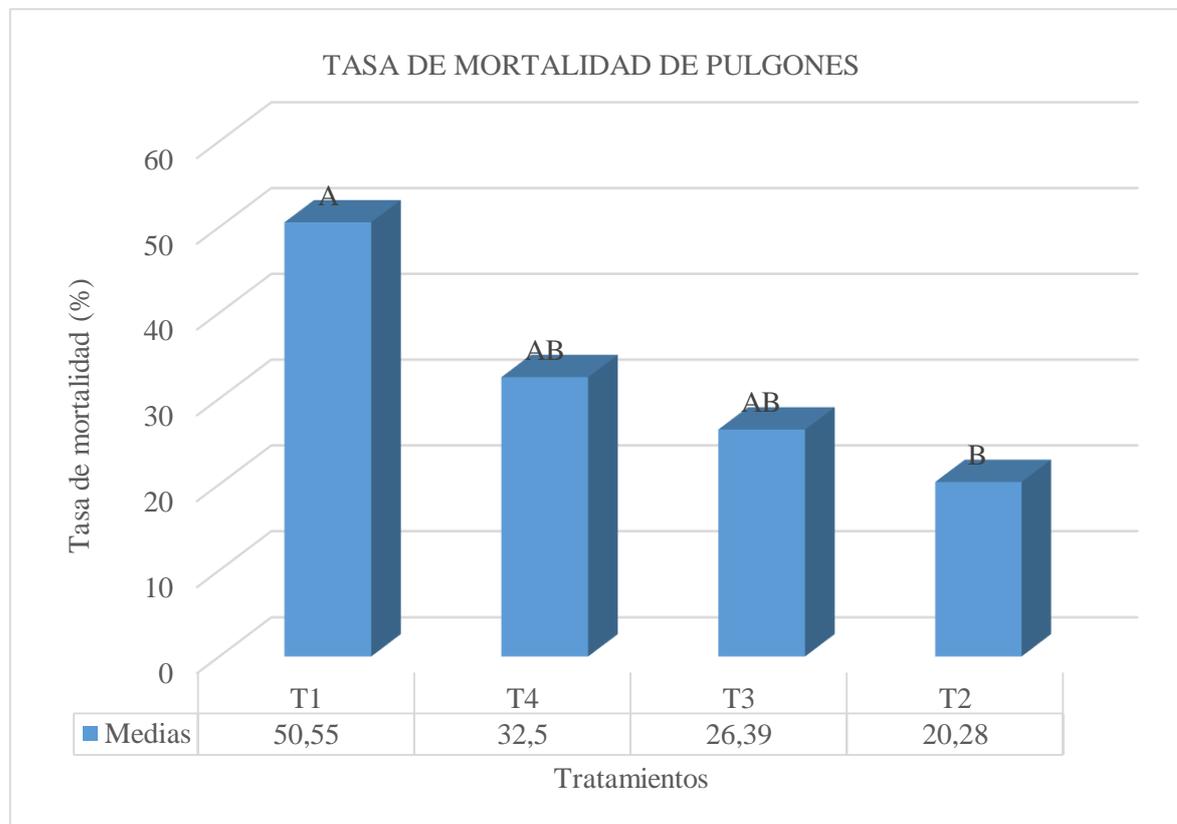


Figura 10.9. Tasa de mortalidad de pulgones. (*Brevicorine brassicae*, L.).
Nota: Elaborado por. (Ortuño. 2019).

XI. CONCLUSIONES

- A. La tasa de crecimiento de *Alternaria* sp in vitro fue de 4,78 mm por día con el tratamiento residuo del endulzado de chocho al 75% (T5), en comparación con el tratamiento absoluto que presenta una media de crecimiento de 6,22 mm por día.
- B. La inhibición micelial de *Alternaria* sp in vitro alcanzó un 25,45% en comparación con el tratamiento absoluto (T1) que no presentó inhibición.
- C. El grado de severidad de *Alternaria* sp a nivel de tejido vegetal fue de 6,89 % con el tratamiento residuo del endulzado de chocho al 75% (T5) en comparación con el testigo absoluto (T1) que fue de 18,22%.
- D. La repelencia de *Brevicorine brassicae*, L. fue de 25,93% con el tratamiento residuo del endulzado de chocho al 75% (T4), en comparación con el tratamiento químico (T1) que fue de 49,45%.
- E. La mortalidad de *Brevicorine brassicae*, L. (Pulgón) fue de 32,5% con el tratamiento residuo del endulzado de chocho al 75% (T4), en comparación con el tratamiento químico (T1) que fue de 50,55 %.

XII. RECOMENDACIONES

- A. Validar el ensayo en campo utilizando los residuos del endulzado de chocho en otros cultivos con problemas de *Alternaria* sp y *Brevicorine brassicae*, L, (pulgón) con las concentraciones evaluadas en laboratorio.
- B. Realizar ensayos utilizando los residuos del endulzado del chocho sobre hongos e insectos, benéficos presentes en los cultivos.
- C. Realizar ensayos con extractos de plantas para potencializar el residuo del endulzado de chocho más los residuos industriales para determinar el efecto sobre el las plagas y enfermedades de los cultivos.
- D. Probar extractos de chochos de diferentes variedades incluyendo el silvestre.
- E. Realizar ensayos utilizando el residuo del endulzado de chocho con el proceso de endulzado de la forma tradicional.

XIII. RESUMEN

La presente investigación propone evaluar el efecto de tres concentraciones de residuos del endulzado de chocho sobre *Alternaria sp* y *Brevicorine brassicae*, L. (pulgón) en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*, L), en el laboratorio del Departamento de Ciencia Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH; se utilizó un diseño completo al azar, con 5 tratamientos, dos testigos control y tres repeticiones. Los tratamientos correspondieron al residuo del endulzado de chocho al (25%, 50% y 75%). Se determinó el porcentaje de inhibición micelial y la tasa de crecimiento en medio de cultivo sintético (PDA + las concentraciones), porcentaje de severidad de *Alternaria sp* en tejido vegetal de brócoli y el porcentaje de repelencia, tasa de mortalidad de (*Brevicorine brassicae*, L.). De acuerdo a los resultados obtenidos el mejor tratamiento en medio de cultivo sintético fue el tratamiento T5 (residuo del endulzado de chocho al 75%), con el cual se obtuvo un porcentaje de inhibición micelial del 25,45% y una reducción en la tasa de crecimiento 4,78 mm por día, en tejido vegetal de brócoli se obtuvo que el tratamiento T5 fue el mejor con una disminución en el grado de severidad de 6,85%, para los efectos evaluados en pulgones el mejor tratamiento fue el tratamiento T4 (residuo del endulzado de chocho al 75%) donde se alcanzó una disminución en la población de pulgones en un 25,93% por acción de repelencia y 32,5% por efectos de mortalidad por ingesta, alcanzando un total de 58,43% de reducción de la población de pulgón durante el manejo en el cultivo de brócoli.

Palabras clave. ENDULZADO DE CHOCHO - INHIBICIÓN MICELIAL - PULGÓN - HONGO FITOPATÓGENO - CULTIVO DE BRÓCOLI.



XIV. SUMMARY

The current research focuses on assessing the effect of three residue concentrations on the sweetened Andean lupine known as chocho over *Alternaria* spp and *Brevicoryne Brassicae*, L. (Aphid) in the broccoli culture (*Brassica oleracea*, L.) Stored in the Biological Sciences department laboratory at the Natural Resources Faculty of the ESPOCH university. A randomized complete desing was used with five treatments, two effective control witnesses and three replications of the process. The treatment corresponded to the sweetened lupine residue at (25%, 50%, 75%). The micelial inhibition and growth rate percentage was evaluated in a synthetic culture medium with a particle dynamic analyzer (PDA + concentrations) a seriousness percentage of *Alternaria* spp on broccoli plant tissue culture and the repellency percentage as to mortality rate of (*Brevicoryne Brassicae*, L.) According to the results obtained, we have determined that the best treatment in the synthetic culture medium was T5 procedure (concentrated residue on the sweetened lupine at 75 %) , in which it was gathered a 25 . 45 percentage of mycelia inhibition and a considerable drop in the growth rate of 4,78 mm per day, on Broccoli plant tissue analysis was discovered that T5 treatment gave a better result with a paramount decrease of 6,85 % on the degree of severity , based on the effects assessed on aphids the best possible treatment was T4 procedure (concentrated residue on the sweetened lupine at 75 %) , where a considerable decline in the plants lice population was reached at a 25,93 % by repellency action and 32,5 % on mortality effects by intake , reaching a total of 58,43 % drop in the Aphids population during the broccoli culture handling.

Key words: <SWEETENED LUPINE<MYCELIA INHIBITION< APHID (PLANT LOUSE)><PATHOGENIC FUNGUS> <BROCCOLI CULTURE



XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1985). Introducción a la fitopatología. En Agrios, *Fitopatología* (pp. 360-362). España: Limusa. Recuperado el 25 de noviembre de 2018, de doi:<https://es.slideshare.net/manuelsandovalb/fitopatologia-agrios>
- Basurto, R. L. (2018). Productos agroindustriales . Recuperado el 21 del 10 del 2018, de TRIPOD: <http://taninos.tripod.com/bernabecobo.htm>
- Bermejo, J. (2011). Información sobre *Brevicoryne brassicae*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de Agrologica: <http://www.agrologica.es/informacion-plaga/pulgon-ceniciento-col-brevicoryne-brassicae/>
- Bermudes, J., & Torres, M. (2008). Efecto insecticida de lupinus mexicanus. *Agrociencia* , pp. 185-191.
- Calvo, J. (2012). Formulación de medios de cultivo. Recuperado el 11 del 10 de 2018, de scielo.org: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v23n2/a01v23n2.pdf>
- Cañizales, G. C. (2009). Control biológico. Recuperado el 11 del 10 del 2018 de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/29752/articulo5.pdf;jsessionid=E8E5630B730D8991530529DD3BBF10B0?sequence=1>
- Carrasco, R. (2014). Propiedades de los residuos del endulzado de chocho. *Valor Nutricional Y Compuestos Bioactivos En Cultivos Andinos*, 112. Lima, Lima, Perú: Fondo Editorial - UNALM.
- Carrasco, R. (2014). Valor nutricional y compuestos bio-activos en cultivos andinos. Lima, Perú: Fondo Editorial UNALM.
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Argentina: ISBN 987-9381-19-X © Universidad Nacional de Salta.
- Coordinadora Ecuatoriana de Agroecología (2010).. Biopesticidas. Recuperado el 10 de Enero del 2019, de <http://urban.agroeco.org/wp-content/uploads/2016/02/BIOPESTICIDAS-CEA-PROGRESSIO.pdf>
- Cerna, B. Y. (2009). Tabla de vida de *Oligonychus punicae* Hirst (Acari: Tetranychidae) en hojas de aguacate (*Persea americana* Mill) variedad hass, fuerte y criollo. *Scielo*, pp. 133-140.
- Centro de Servicios Técnicos y Transferencia tecnológica Ambiental. (18 de enero de 2016). Resultados de los análisis del agua residual del chocho. *informe técnico# 12*. Riobamba, Chimborazo, Ecuador : CESTTA.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (2016). Modelo tecnológico para el cultivo de brócoli en el departamento de Antioquia Brassica olerácea L. var. Itálica. Medellín: Siembra.

- EcuRed. (2014). Taxonomía de pulgones. Enciclopedia Colaborativa Online Cubana. Recuperado el 10 de Enero de 2019, de EcuRed: https://www.ecured.cu/Pulg%C3%B3n_de_la_col
- Ellis, B. (1976). *More dematiaceous hyphomycetes*. Inglaterra: Cambrian Printes Ltd, Aberystwyth.
- Gil, L. (2015). Guía práctica para identificación de las características morfológicas de las colonias de hongos. Recuperado el 10 de Enero de 2019, de Microbitos.blogspot: <http://microbitosblog.com/2010/06/14/morfologia-colonial-bacteriana/>
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2009). Estudio de los alcaloides del chocho. Recuperado el 10 de Enero del 2019, de. <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/ALCALOIDES%20DEL%20CHOC HO.pdf>
- Jarrin, P. (2003). Tratamiento del agua del desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet), proveniente de la planta piloto de la estación experimental INIAP. (Tesis de grado. ingeniero Químico Farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Recuperado el 10 de Enero de 2019, de Repositorio ESPOCH: bibliotecas.espoch.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=40118
- Lara, E. (2009). Efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), sobre *Alternaria solani* y *Fusarium solani*. Trujillo: REBIOL.
- Lara-Sánchez, E. D., González-Hernández, Á., & Hernández-Juárez, A. (2013). Comparación de dos métodos de bioensayos para determinar la toxicidad de plaguicidas en *Apis mellifera* L. (apidae: hymenoptera). *Socmexent*, pp. 1393-1396.
- Martínez, E., Sanromá, B., & Rosveti, L. (2006). *Manejo integrado de plagas, manual práctico*. La Habana: Tarragona, Cataluña, España.
- Medina, A. (2014). Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de brócoli (*brassica oleracea* var. *italica*), sector brigada patria – cotopaxi. Tesis de grado ingeniero agrónomo, Universidad Técnica de Cotopaxi. Recuperado el 15 de 10 de 2018, de Repositorio UTC: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2520?mode=full>
- Moreno, R. (2014). Conteo de células en la cámara de Neubauer. Recuperado el 10 de Enero de 2019, de Insilico: http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php
- Orellana, H., Solórzano, H., Bonilla, A., Salazar, G. C., & Velasteguí, R. (2008). *manejo orgánico ecológico del cultivo de brócoli*. Recuperado el 21 de Octubre de 2018, de QUICKAGRO: https://quickagro.edifarm.com.ec/pdfs/manual_cultivos/BROCOLI%20ORGANICO.pdf
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura . (2010). *Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana*. Santiago de Chile: FAO-IPES.

- Rinel, A. E. (04 de 2016). Técnicas de aislamiento de fitopatógenos. *Scielo*, 28-30. Recuperado el 10 de 10 de 2018, de /scielo.sld.cu: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v31n1/rpv09116.pdf>
- Rivas, L. M. (2014). *Alternaria spp.* *Rev Chilena Infectol*, pp. 5.
- Rodríguez, A. (2009). Evaluación in-vitro de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), (Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Recuperado el 10 de Enero de 2019, de Repositorio ESPOCH: www.esPOCH.edu.ec
- Sistema de Información y Comunicación del sector Agropecuario Costarricense. (2010). *control de aphidos y pulgones*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de InfoAgro: <http://www.infoagro.com/hortalizas/pulgones.htm>
- Santoyo, J., & Martínez, O. (2010). *Centro de Validación y Transferencia de Tecnología de Sinaloa, A. C., zona sur*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de Tecnología de producción de brócoli: <https://www.fps.org.mx/portal/.../35-otros?...tecnologia-de-produccion-de-brocoli>
- Sepúlveda, P., & Tay, K. (2011). *Alternaria spp., Una enfermedad importante en el cultivo de la zanahoria para el alto LOA*. Región de Antofagasta: INIA-CALAMA.
- Sharma, P. (2014). *Measurement of disease*. Recuperado el 19 de Diciembre de 2018, de PI Path 111: www.hillagric.ac.in/.../Lect.%209.%20P1%20Path%20111-%20M
- Sistema de Información del Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2016). *boletín situacional de brócoli*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2014/cboletin-situacional-brocoli-2014-actualizado.pdf>
- Vargas, A. A. (2009). *Alternativas naturales para el control de Alternaria chrysanthemi Simmons & Clossier*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de docplayer.es: <https://docplayer.es/91469269-Alternativas-naturales-para-el-control-de-alternaria-chrysanthemi-s-imm-n-s-8-cros-ier.html>

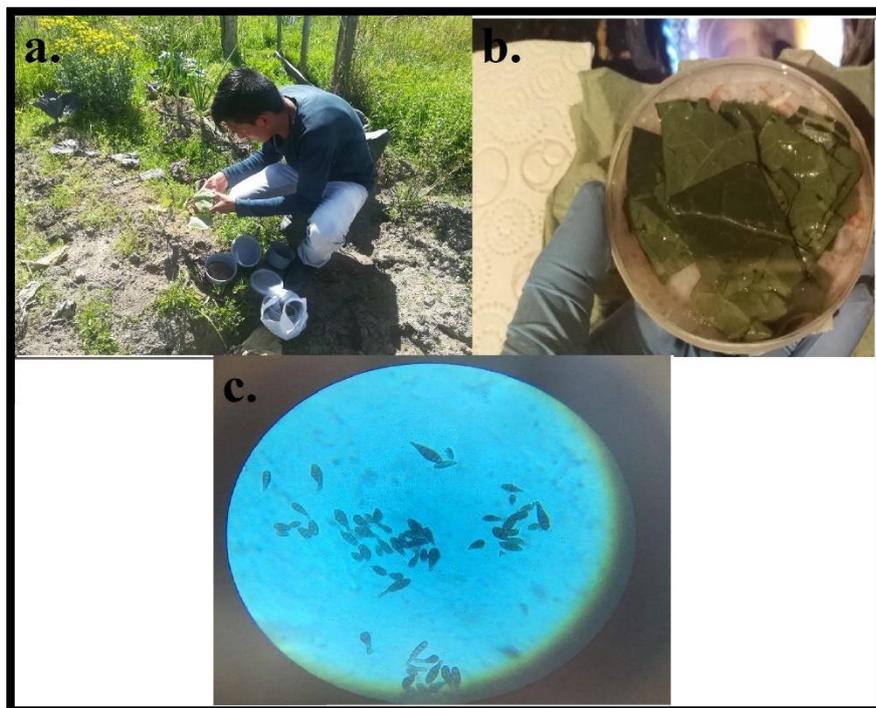
XIV. ANEXOS.

Anexo 1. Metodología: fase de campo. Recolección de muestras.

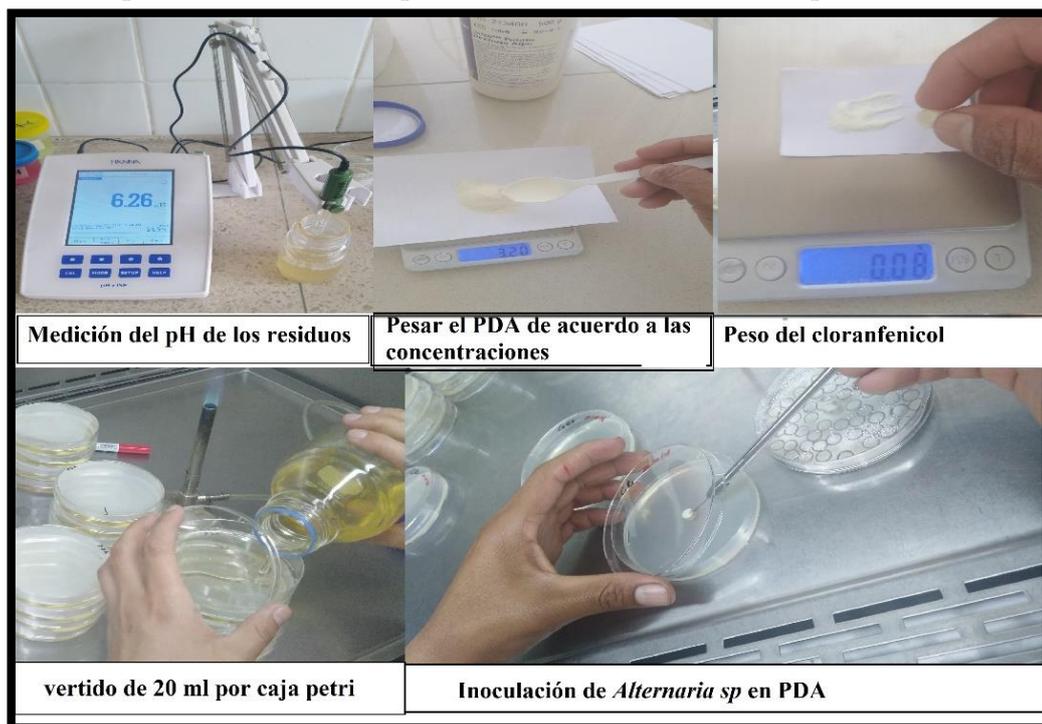


Nota. . recolección y transporte de las muestras, captura de pulgones . Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 2. Identificación bajo microscopio de *Alternaria* sp recolectada de cultivos de brócoli infestados.



Nota. A). Recolección de hojas de brócoli infectadas con *Alternaria* sp, b). Cámara húmeda de las muestras, c). Esporas de *Alternaria* sp vistas bajo el microscopio con el lente de 40X. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 3. Preparación de los medios para la inoculación de *Alternaria* sp.

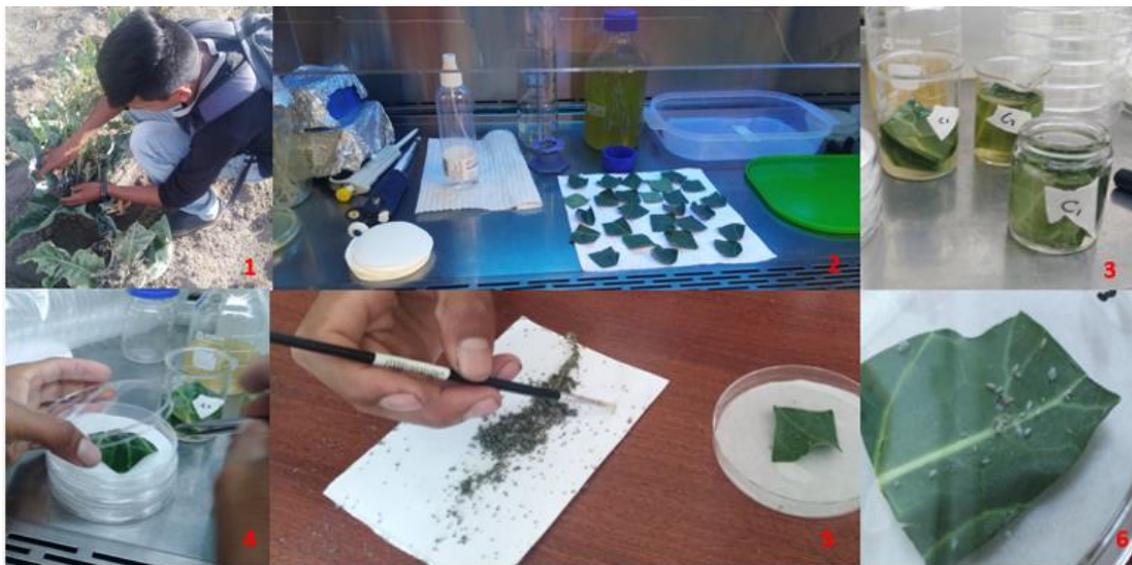
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 4. Pruebas de patogenicidad en fragmentos de hojas de brócoli.



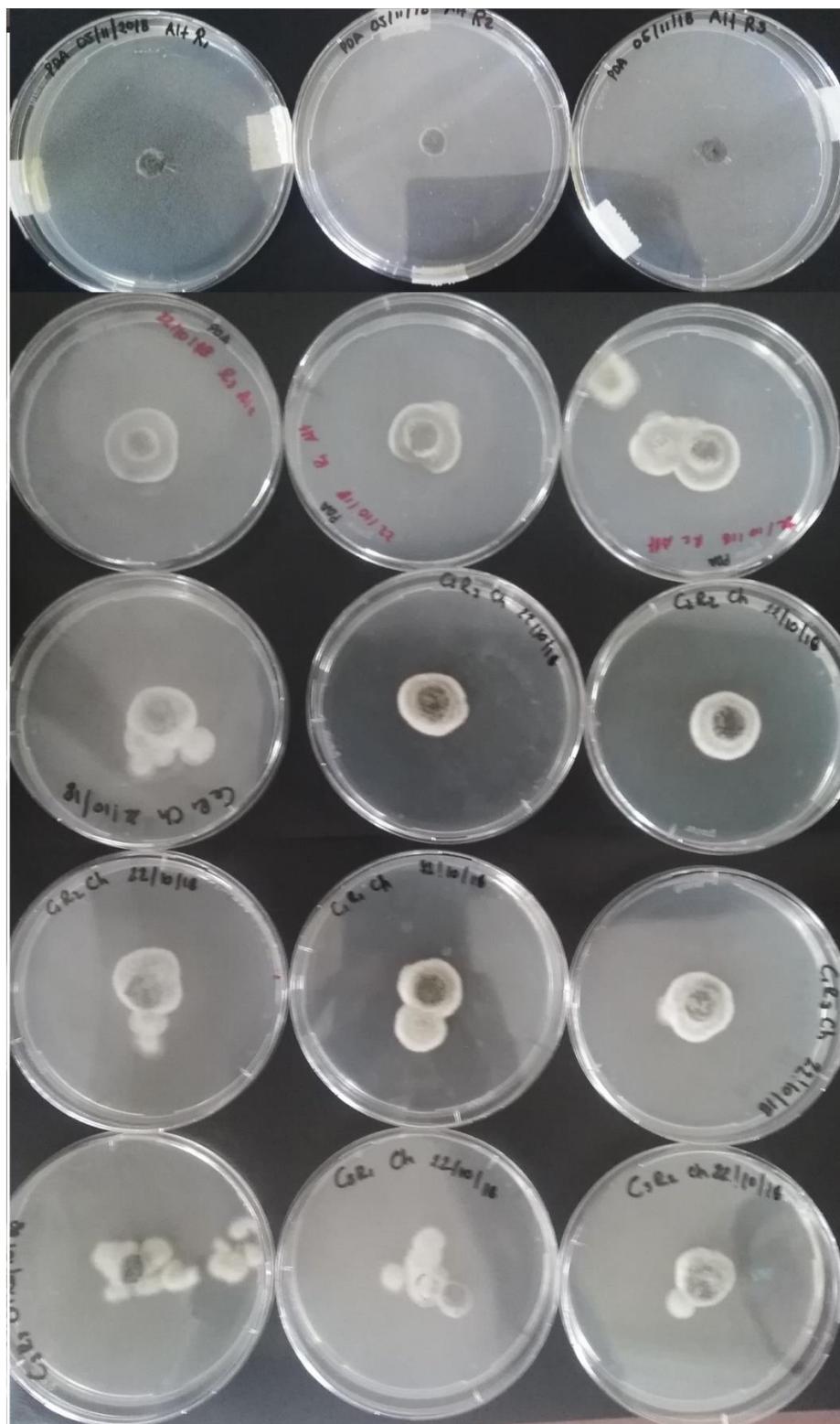
Nota. 1. Recolección y preparado de los fragmentos, 2. Lavado y desinfección de los fragmentos, 3. Inmersión de los fragmentos en las concentraciones, 4. Cajas Petri como cámara húmeda, 5. Inoculación de una suspensión conocida de esporas. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 5. Efectos del residuo del endulzado de chocho sobre pulgones.



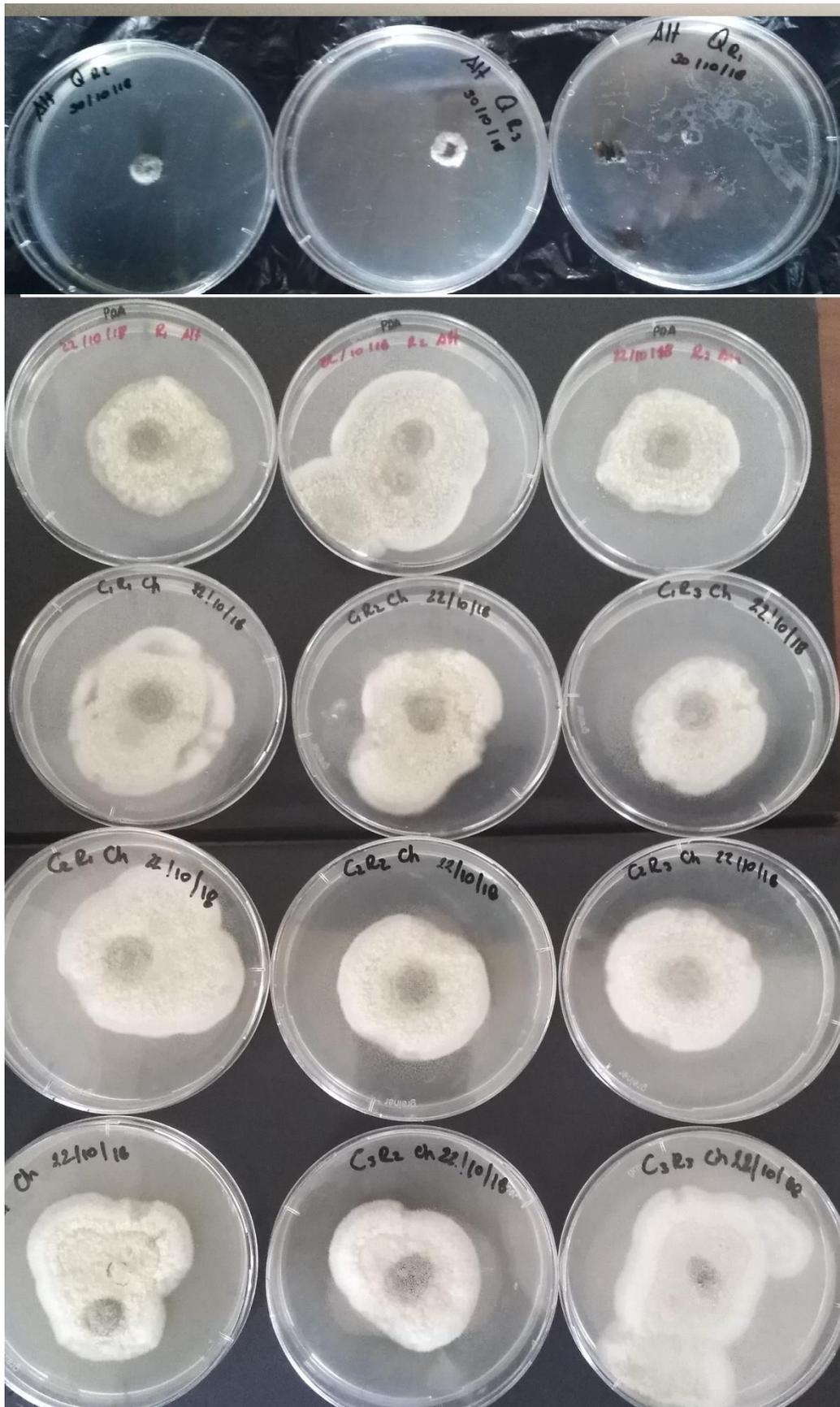
Nota. . 1. Captura de pulgones, 2. Lavado y desinfección de los fragmentos, 3. Inmersión de los fragmentos en las concentraciones, 4. Cajas Petri como cámara húmeda, 5. Transferencia de los pulgones, 6. Determinación de la tasa de mortalidad y el porcentaje de repelencia. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 6. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de *Alternaria sp* en medio sintético.



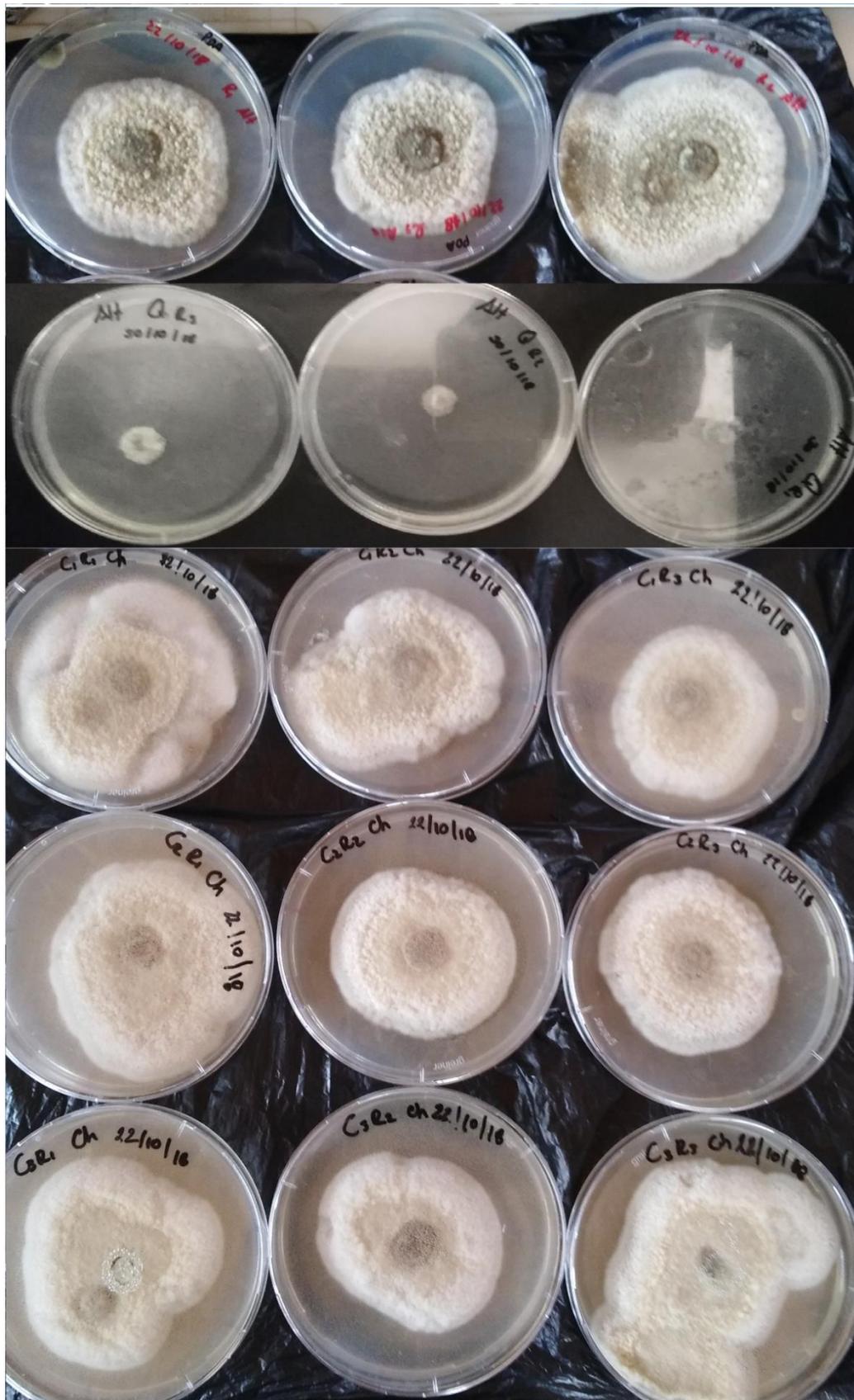
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 7. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de *Alternaria* sp en medio sintético.



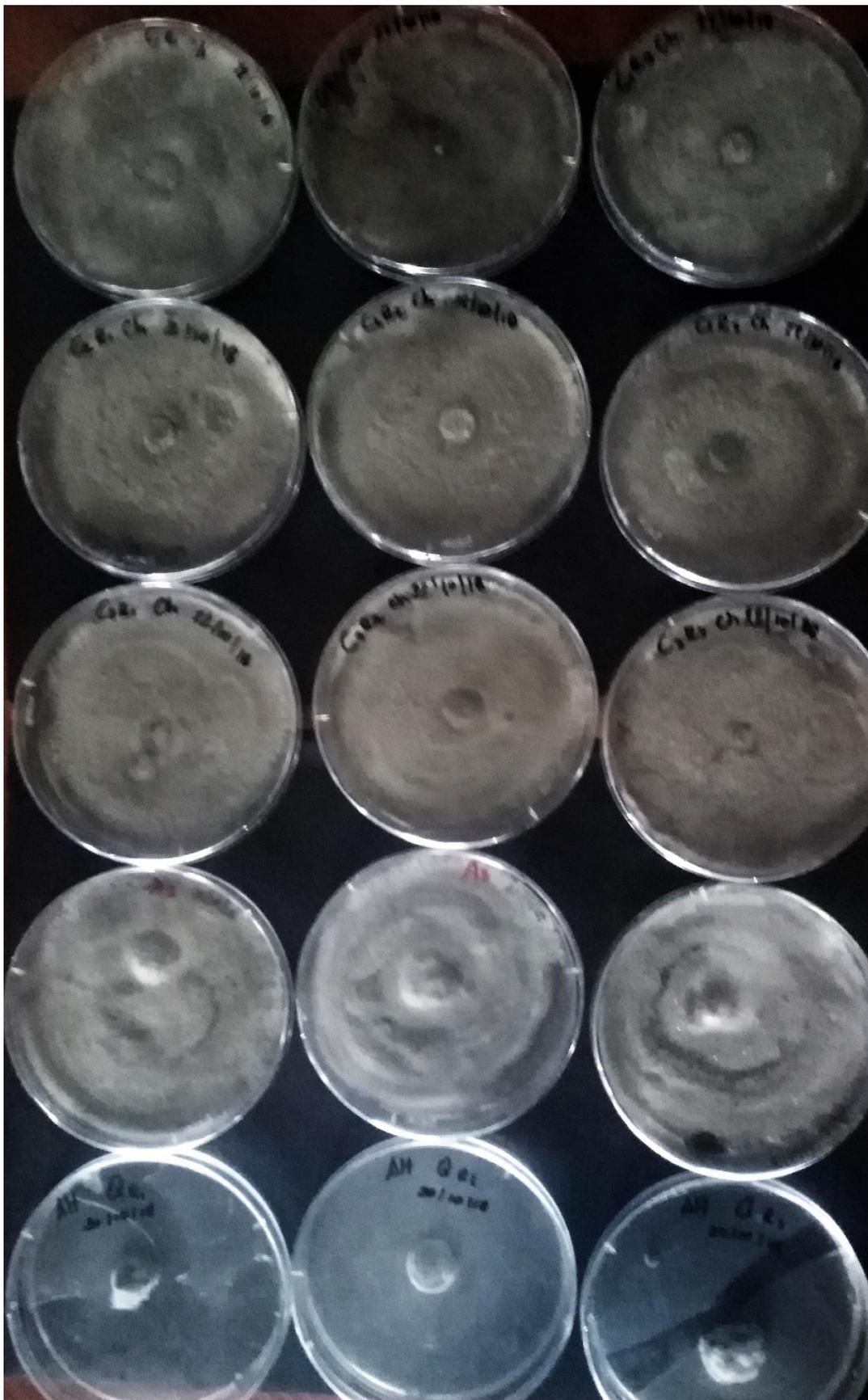
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 8. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de *Alternaria* sp en medio sintético.



Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 9. Pruebas de antagonismo en medio sintético. Tasa de crecimiento e inhibición micelial de *Alternaria* sp en medio sintético.



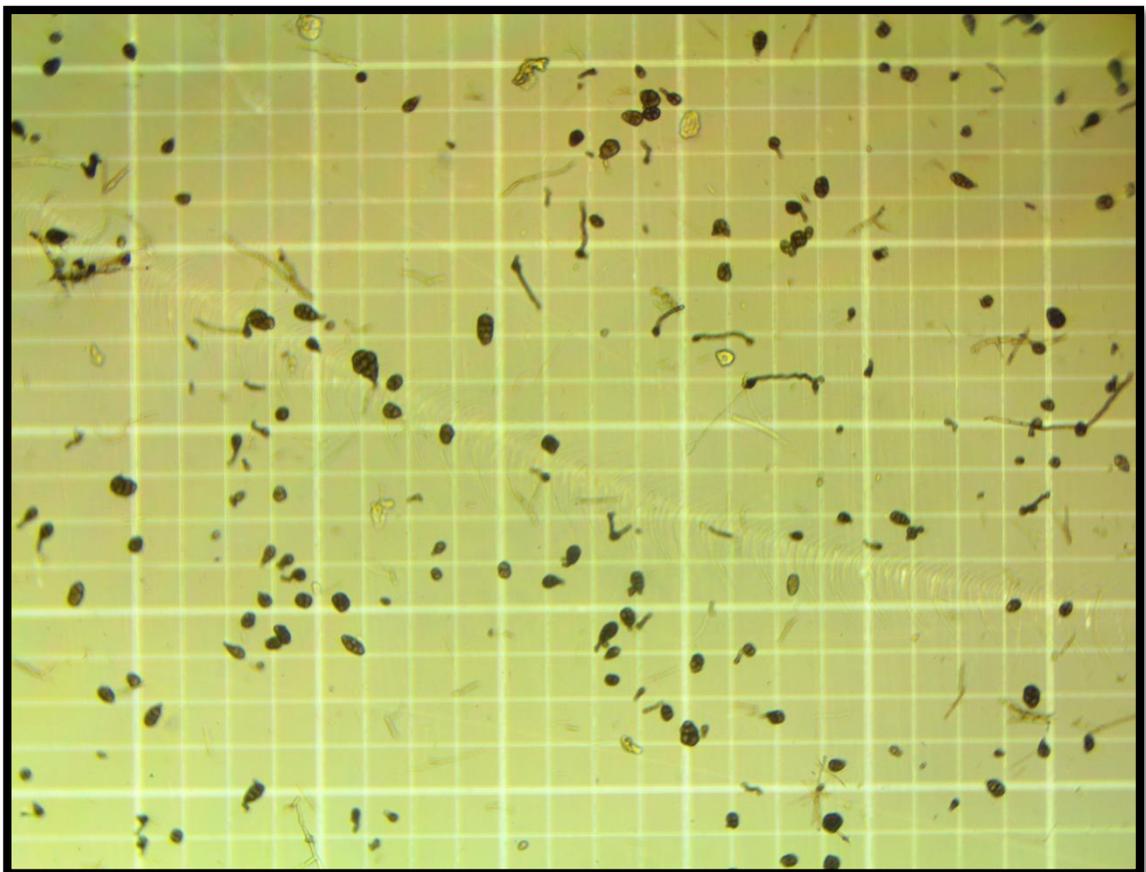
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 10. Numero de esporas producidas



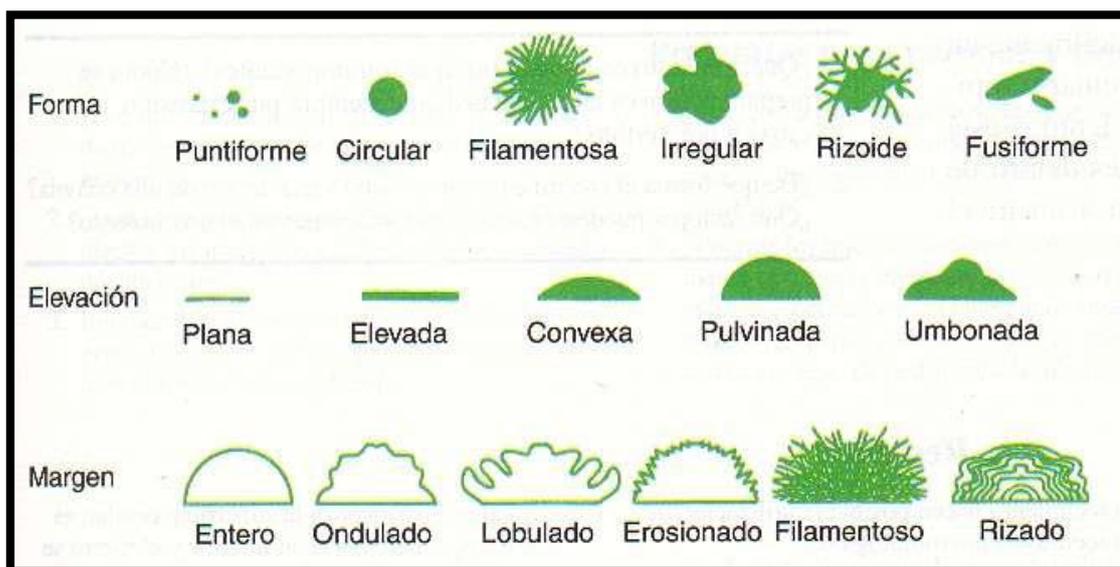
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 11. Conteo de esporas de las tres repeticiones del tratamiento absoluto en la cámara de Neubauer, obteniendo un promedio de 108 esporas y una solución de 2.7×10^5 .



Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 12. Guía de identificación de características morfológicas de las colonias



Nota. Fuente: (Gil, 2015)

Anexo 13. Escalas de colores de verde.

Verde	Cartuja	Enebro	Salvia
Lima	Helecho	Oliva	Esmeralda
Pera	Musgo	Trébol	Espuma de mar
Pino	Periquito	Menta	Alga
Escabeche	Pistacho	Albahaca	Cocodrilo

Nota. Escalas de colores de verde. Fuente. Pinterest.com

Anexo 14. Identificación de las características morfológicas de las colonias de *Alternaria* sp.



Nota. Identificación de las características morfológicas de las colonias, basándose en una observación directa de cada característica y en base a guías y a trabajos realizados. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 15. Pruebas de antagonismo en tejido vegetal sano.

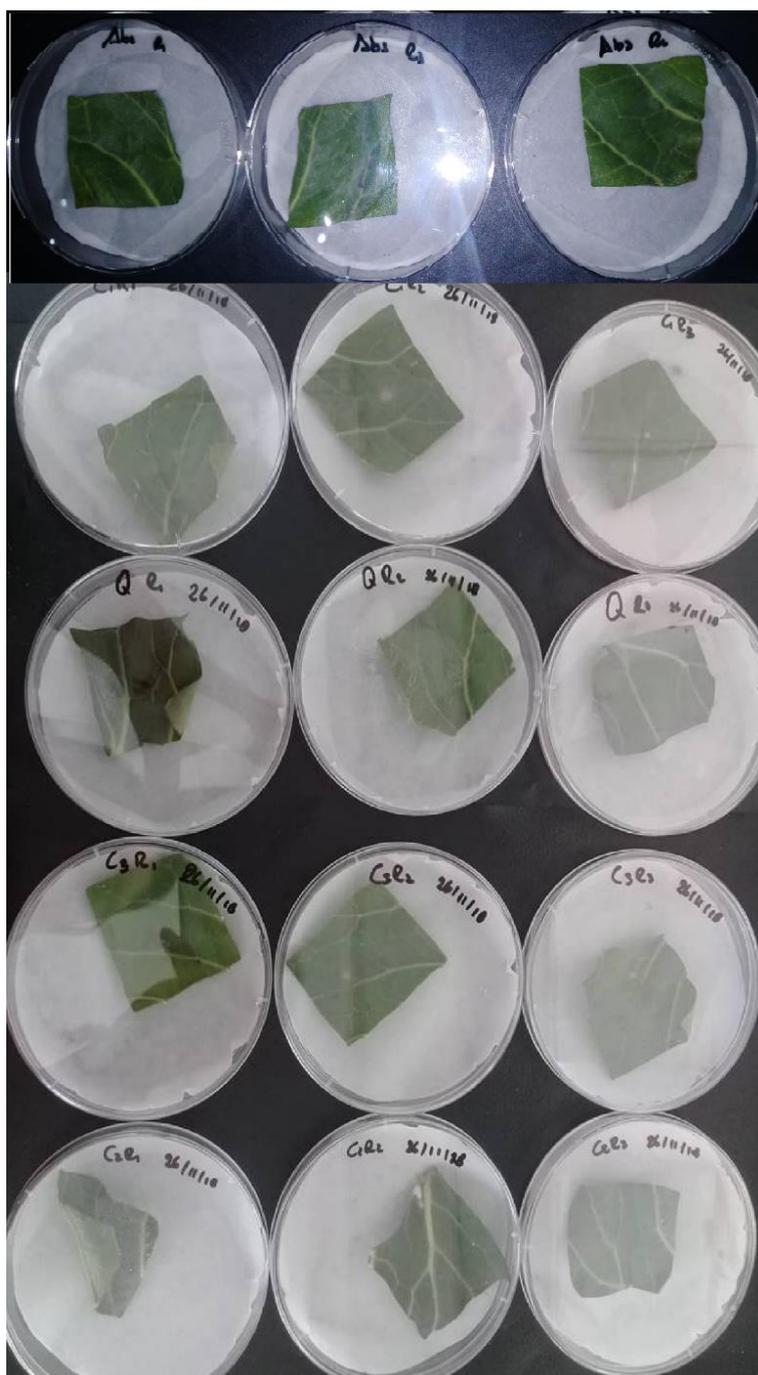


Nota. A partir de la suspensión de esporas de 10^5 se procedió a inocular los fragmentos de hojas de brócoli de 4x 4 cm con 10 μ l de suspensión de esporas. Elaborado por (Ortuño, 2019)

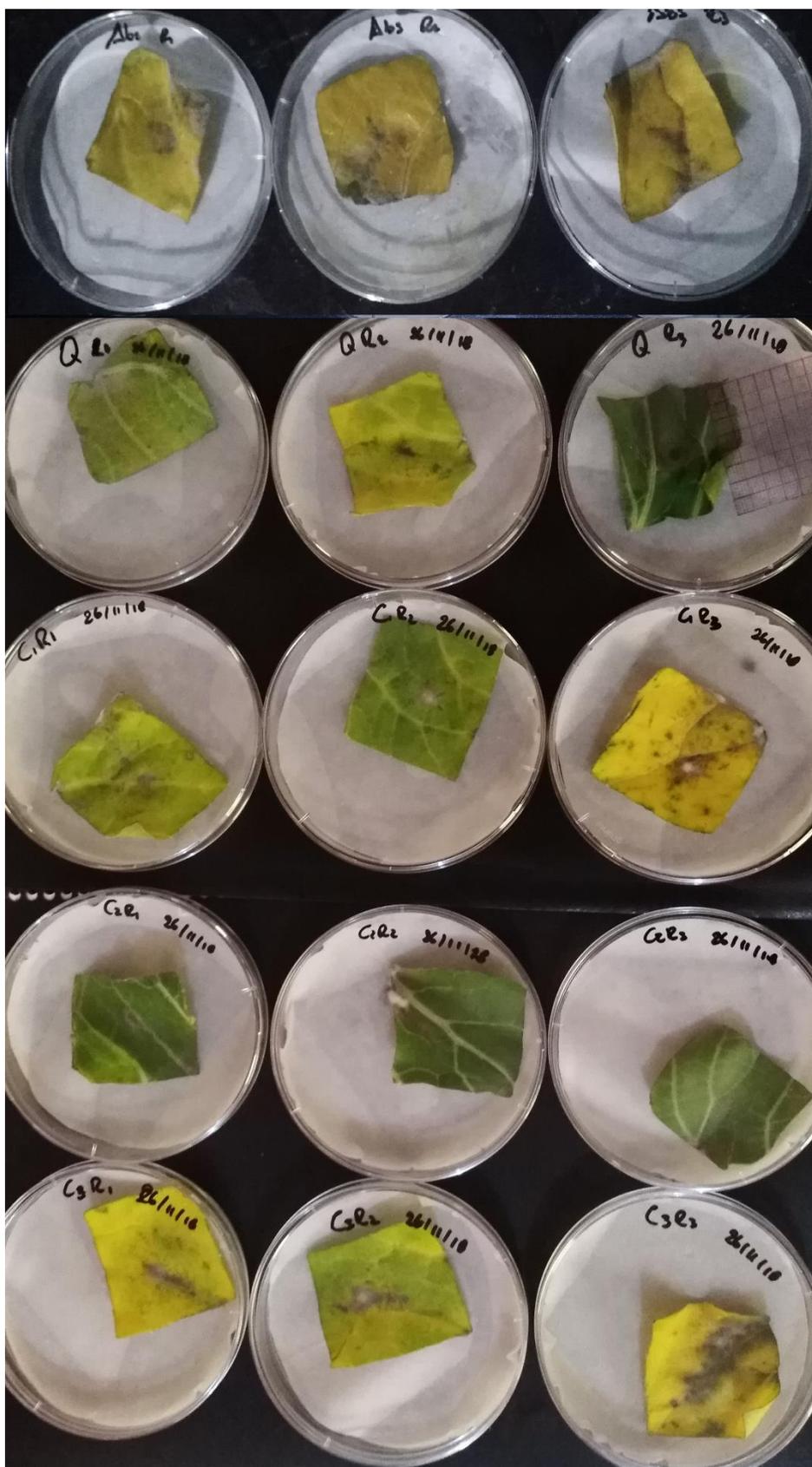
Anexo 16. Escala descriptiva de severidad de *Alternaria* sp

Escala	Descripción
0	No hay enfermedad en la hoja
1	Mancha concentrica pequeña que cubre <1% del área foliar
3	Manchas concéntricas que cubren del 1-10% del área foliar
5	Manchas concéntricas que cubren del 11-25% área foliar
7	Manchas concéntricas que cubren del 26-50% área foliar
9	Manchas concéntricas >50% del área foliar

Nota. Escala adaptada para *alternaria* sp. Fuente. (Sharma, 2014).

Anexo 17. Evaluación de la incidencia de *Alternaria* sp sobre fragmentos de hojas.

Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 18. Evaluación de la severidad de *Alternaria* sp sobre fragmentos de hojas de brócoli.

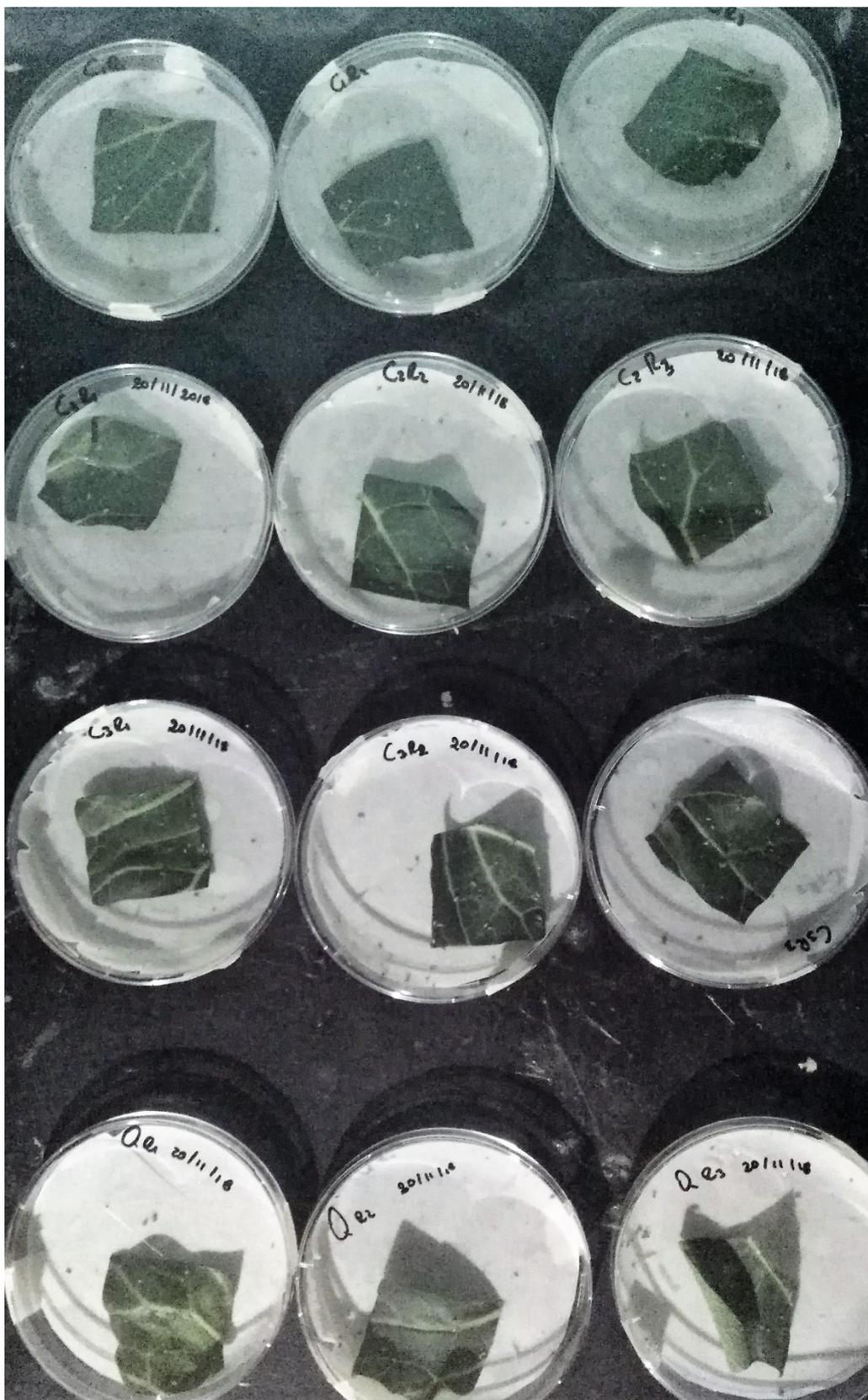
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 19. Captura de pulgones de cultivos de brócoli infestados



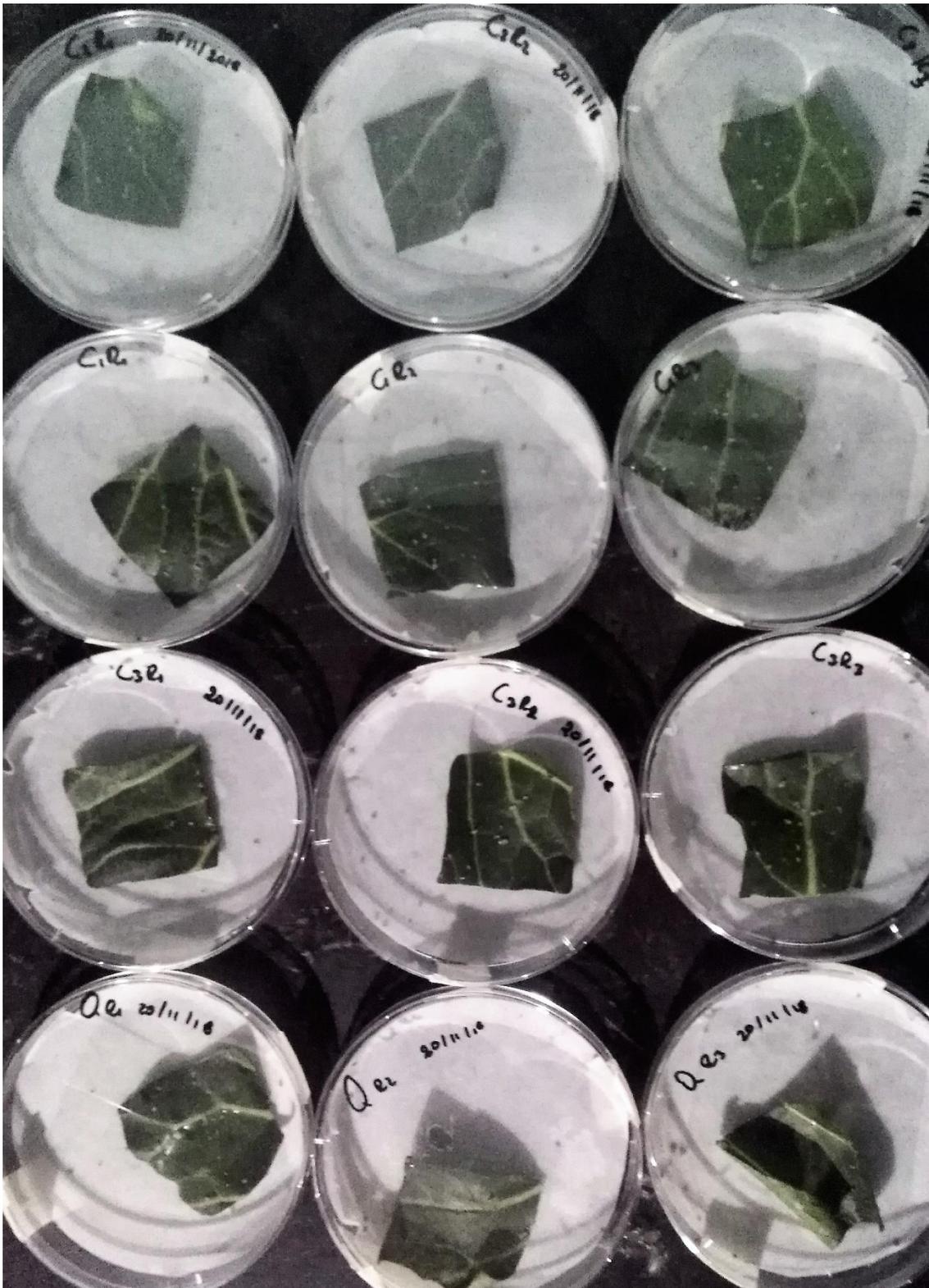
Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 20. Pruebas sobre pulgones. Evaluación de la repelencia de los residuos.



Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)

Anexo 21. Pruebas sobre pulgones. Evaluación de la de la tasa de mortalidad.



Nota. Elaborado por (Ortuño, 2019)