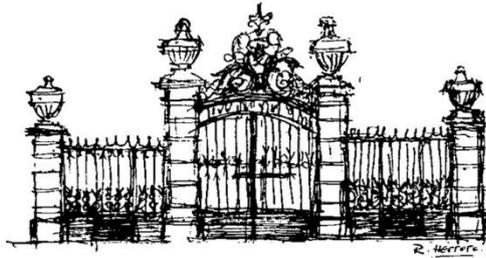


UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS



**EFEECTO DE LA APLICACIÓN CONJUNTA DE ZINC Y
NITRÓGENO FOLIAR SOBRE EL CULTIVO DEL BRÓCOLI**

(Brassica oleracea L. var. italica l.)

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Virginia García Méndez

Badajoz, Junio 2019

TRABAJO FIN DE MÁSTER
EFFECTO DE LA APLICACIÓN CONJUNTA DE ZINC Y NITRÓGENO
FOLIAR SOBRE EL CULTIVO DEL BRÓCOLI

(Brassica oleracea L. var. italica L.)

MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTOR: Virginia García Méndez

TUTOR/ES:

Tutor: M^a José Poblaciones Suárez-Bárcena

Cotutor: Angélica Rivera Martín

Fdo:.....

Fdo:.....

Convocatoria: Junio 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. El Zinc. Importancia en las plantas, animales y el ser humano	10
2.1.1. Zinc en el suelo	10
2.1.2. Zinc en las plantas.....	13
2.1.3. Zinc en los animales.....	14
2.1.4. Zinc en el ser humano.	15
2.2. Necesidades de ingesta: Principales problemas.	16
2.3. Estrategias de remediación.....	16
2.3.1. Biofortificación	17
2.3.2. Combinación de biofortificación genética y agronómica	18
2.4. El cultivo del brócoli	20
2.4.1. Importancia económica del cultivo del brócoli	21
2.4.2. Calidad nutritiva del brócoli.....	22
2.4.3. Experiencias previas en biofortificación agronómica en el género Brassica.....	25
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL Y MÉTODOS	30
4.1. Localización del proyecto	30
4.2. Recogida del suelo y determinación de sus principales características	30
4.3. Diseño experimental.....	31
4.3.1. Determinaciones en plantas y suelo	33
4.3.2. Análisis de Zn, Ca, Fe y Mg.....	33
4.4. Análisis estadístico.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.1. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de la planta	36
5.2. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Ca, Fe, Mg y Zn en las diferentes partes de la planta.....	41
5.2.1. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Ca en las diferentes partes de la planta	41

5.2.2. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Fe en las diferentes partes de la planta.....	44
5.2.3. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Mg en las diferentes partes de la planta.....	47
5.2.4. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Zn en las diferentes partes de la planta	50
6. CONCLUSIONES	54
7. BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Principales factores químicos y físicos del suelo que afectan la biodisponibilidad de Zn en las raíces. Fuente: Cakmak I (2007).....	11
FIGURA 2.2. Porcentaje- de distribución de Zn-DTPA inferior o superior a 0,5 mg kg-1 según el pH y el contenido en materia orgánica del suelo. Fuente: Eyupoglu et al. (1994). ...	12
FIGURA 2.3. Distribución global de las zonas afectadas por la carencia de Zn. Fuente: Alloway (2004).	13
FIGURA 4.2. Localización del ensayo. Fuente: Google maps.....	30
FIGURA 5.1. Efecto del tratamiento de Zn sobre el peso seco de las hojas de brócoli.	38
FIGURA 5.2. Efecto del tratamiento de Zn sobre el peso seco del tallo de brócoli.	39
FIGURA 5.3. Efecto del tratamiento de Zn sobre el peso seco de la pella de brócoli.....	39
FIGURA 5.4. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.....	43
FIGURA 5.5. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.....	46
FIGURA 5.6. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.....	49
FIGURA 5.7. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1. Composición nutricional del brócoli en 100 gramos de porción comestible.....	23
TABLA 5.1. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) de la altura de la planta, altura de la pella, diámetro mayor (D) y menor (d) de la pella, la relación entre ambos (D/d), diámetro del tallo y peso seco de hojas, tallo y pella de brócoli según el tratamiento de Zn empleado.....	36
TABLA 5.2. Efecto del tratamiento de Zn sobre la altura de la planta, altura de la pella, diámetro mayor (D) y menor (d) de la pella de brócoli, la relación entre ambos (D/d) y el diámetro del tallo.....	37
TABLA 5.3. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) de las concentraciones de Ca, Fe, Mg y Zn según la parte analizada y el tratamiento de Zn empleado.	41
TABLA 5.4. Efecto del tratamiento de Zn sobre la concentración de Ca en cada una de las fracciones del brócoli.	42
TABLA 5.5. Efecto del tratamiento de Fe sobre la concentración de Fe en cada una de las fracciones del brócoli.	45
TABLA 5.6. Efecto del tratamiento de Zn sobre la concentración de Mg en cada una de las fracciones del brócoli.	48
TABLA 5.7. Efecto del tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn en cada una de las fracciones del brócoli.	50

CAPÍTULO 1

RESUMEN

1. RESUMEN

El Zinc (Zn) es un mineral esencial para los animales, las plantas y humanos, pero en muchas ocasiones su ingesta no es suficiente y provoca en los animales abortos, anorexia, en plantas disminuye la calidad y el rendimiento y en el ser humano su deficiencia acarrea cardiopatías, asma e incluso la muerte en los casos más graves. Para paliar estas deficiencias, se realizó un experimento con siete tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, en el cultivo del brócoli (*Brassica oleraceae L. var. Itálica l.*), los cuales fueron: Tratamiento control (C) sin aplicación de Zn ni nitrógeno (N), aplicación foliar de 15 ml 0,5% de s/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en el momento de aparición de la pella ($0,5M_1$), aplicación foliar de 15 ml 0,5% de s/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ a las dos semanas de aparición de la pella ($0,5M_2$), tratamiento combinado de 15 ml 0,5% de s/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ con N en el momento de aparición de la pella ($0,5M_1N$), tratamiento combinado de 15 ml 0,5% de s/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ con N a las dos semanas de aparición de la pella ($0,5M_2N$), tratamiento foliar de 15 ml 0,25% de s/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ aplicado en dos momentos, en la aparición de la pella y a las dos semanas ($0,25M_1+0,25M_2$) y tratamiento combinada de 15 ml 0,25% de s/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ con N aplicado en dos momentos, en la aparición de la pella y a las dos semanas ($0,25M_1N+0,25M_2N$). Se determinó el efecto sobre el crecimiento y acumulación de Ca, Fe, Mg y Zn en hojas, tallo y pella. Ni la altura de la planta ni la de la pella se vieron influidas de manera significativa por los tratamientos aplicados, al igual que el tamaño y forma de la pella ni diámetro del tallo. Se observó un efecto tóxico en el tratamiento $0,5M_2$ que provocó, por un lado, un menor peso seco en hojas, tallo y pella y por otro una acumulación excesiva de Zn. Mientras que el Fe, Mg y Zn se acumularon mayoritariamente en la pella, el Ca en las hojas. Todos los nutrientes estudiados variaron significativamente con la aplicación de Zn a excepción del Mg, pero teniendo en cuenta el objetivo de la biofortificación, el tratamiento que ha sido más positivo es el $0,25+0,25$ aunque también $0,5M_2N$. La ingesta de 100 g de brócoli biofortificado con el tratamiento $0,25+0,25$ supondría una ingesta de 10,6 g si lo que se ingieren son las pellas, 10,2 g si es de hojas y 1,6 g si es de tallo, por lo que se cubren dos tercios de las necesidades de hombres y mujeres en el caso de pellas y hojas, significando solamente un 10% en el caso de ingerir tallos.

CAPÍTULO 2
INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El Zinc. Importancia en las plantas, animales y el ser humano

Los minerales, desde el punto de vista de la dieta humana, son elementos químicos inorgánicos necesarios para procesos biológicos o bioquímicos. Existen 16 minerales esenciales 11 de ellos son requeridos en cantidades bajas y/o son tan abundantes que su deficiencia ocurre en muy raras condiciones. Los otros cinco pueden presentarse de manera deficiente en la alimentación humana, principal vía de incorporación en el organismo. Estos minerales son el yodo (I), hierro (Fe), zinc (Zn), calcio (Ca) y selenio (Se) (White y Boadley, 2005; Graham et al., 2007).

2.1.1. Zinc en el suelo

Un programa exitoso de mejoramiento para biofortificar cultivos alimentarios con Zn depende de la cantidad de Zn disponible para las plantas en el suelo. Se ha comprobado que entre los factores químicos del suelo, el pH del suelo desempeña el papel más importante en la solubilidad del Zn en la solución del suelo. En un rango de pH entre 5,5 y 7,0, la concentración de Zn en la solución del suelo se reduce entre 30 y 45 veces por cada unidad de aumento del pH del suelo, aumentando así el riesgo de desarrollo de deficiencia de Zn en las plantas (Marschner, 1993). Aumentar el pH del suelo retrasa la adsorción del Zn a los constituyentes del suelo (por ejemplo, óxidos metálicos, minerales arcillosos) y reduce la desorción del Zn adsorbido (Figura 1.1.). Lindsay (1991) reportó que a pH 5.0 la concentración de Zn^{+2} en la solución del suelo es suficientemente alta, alrededor de 10^{-4} M (6,5 mg kg⁻¹). Cuando el pH del suelo aumenta de 5 a 8, la concentración del suelo Zn^{+2} se reduce 1 000 veces y se convierte en casi 10^{-10} M (aproximadamente 0,0007 mg kg⁻¹). Por consiguiente, un aumento en el pH del suelo se asocia con disminuciones muy pronunciadas en las concentraciones de Zn en los tejidos vegetales (Sarkar y Wyn Jones, 1982; Marschner, 1995).

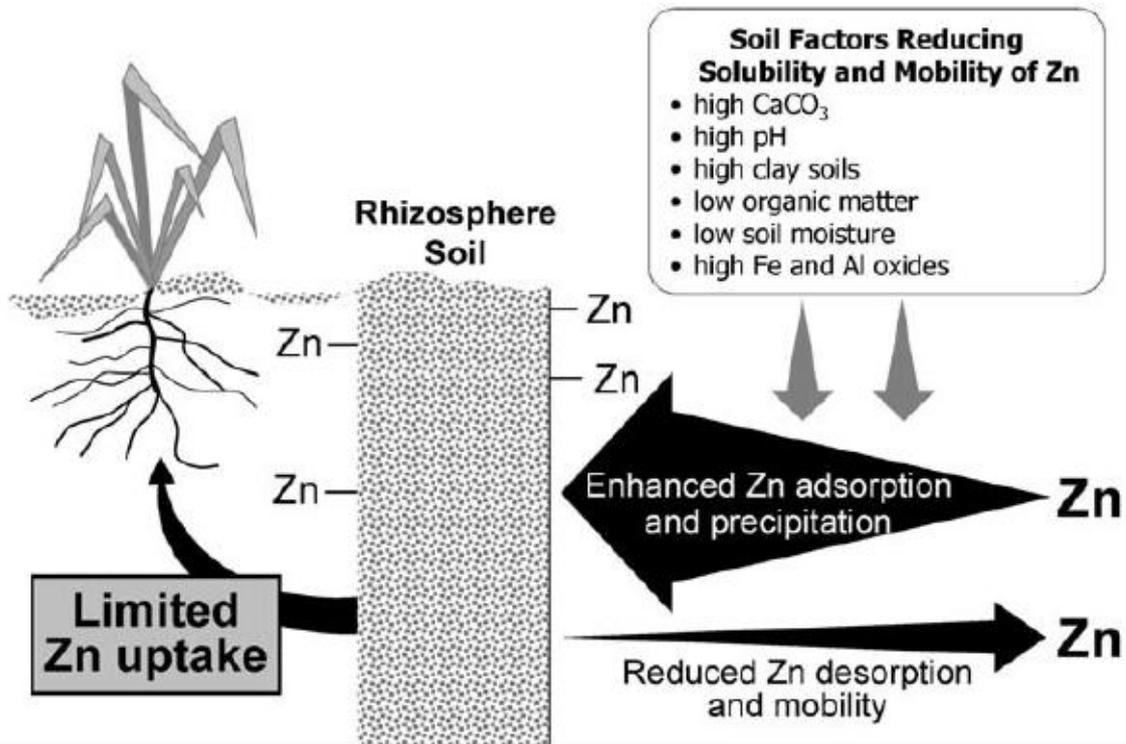


FIGURA 2.1. Principales factores químicos y físicos del suelo que afectan la biodisponibilidad de Zn en las raíces. Fuente: Cakmak I (2007)

El transporte de Zn a la superficie radicular en los suelos se produce principalmente por difusión (Wilkinson et al., 1968), y este proceso es muy sensible al pH y a la humedad del suelo, siendo ésta, un factor físico clave que proporciona un medio adecuado para una difusión adecuada de Zn a las raíces de las plantas y desempeña un papel muy crítico en suelos con baja disponibilidad de Zn (Rattan y Deb, 1981; Marschner, 1993). Por lo tanto, la nutrición de las plantas con Zn se ve afectada negativamente en condiciones de estrés hídrico, especialmente en regiones donde los suelos superficiales suelen estar secos durante las últimas etapas del crecimiento de los cultivos (Figura 1.2).

La materia orgánica del suelo juega un papel crítico en la solubilidad y el transporte de Zn a las raíces de las plantas (Marschner, 1993; Obrador et al., 2003). En un estudio con 18 suelos de Colorado (EE.UU.), hubo una fuerte relación inversa entre el contenido de materia orgánica del suelo y las concentraciones de Zn solubles en la rizosfera (Catlett et al., 2002). En Turquía los suelos, especialmente los de la Anatolia Central, se caracterizan por bajos niveles de materia orgánica y elevados pH del suelo (Eyupoglu et al., 1994; Cakmak et al., 1996). En la realización de un estudio de 1.511 muestras de suelo de Turquía realizado por Eyupoglu et al. (1994) se ha descubierto que las concentraciones de ácido dietilnitrilopentaacético extraíble (Zn-DTPA) están inversamente relacionadas

con el pH y la materia orgánica del suelo (Figura 1.3). En general, los suelos que contienen menos de 0,5 mg de Zn extraíble con DTPA se consideran potencialmente deficientes en Zn y pueden responder bien a los fertilizantes de Zn (Lindsay y Noverll, 1978). El porcentaje de suelos que contienen DTPA-Zn superior a 0,5 mg kg⁻¹ es mucho mayor en suelos con valores de pH entre 4 y 6 que en suelos con pH entre 7 y 8 o superior. También se encontró una relación similar entre el Zn-DTPA y la materia orgánica del suelo (Figura 1.2.) indicando que la reserva de Zn fácilmente disponible para plantar raíces puede ser extremadamente baja en suelos con pH alto y niveles reducidos de materia orgánica y humedad del suelo.

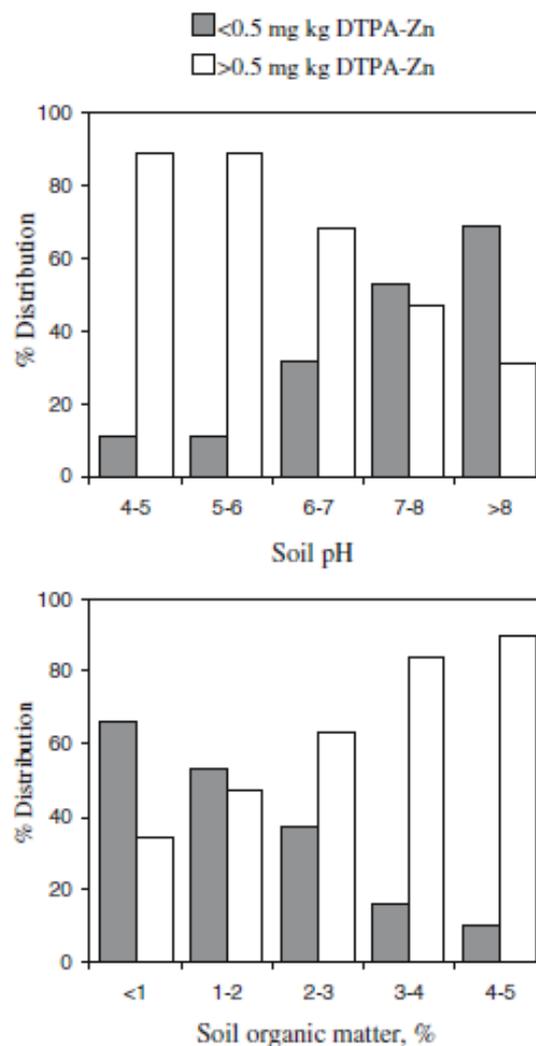


FIGURA 2.2. Porcentaje- de distribución de Zn-DTPA inferior o superior a 0,5 mg kg⁻¹ según el pH y el contenido en materia orgánica del suelo. Fuente: Eyupoglu et al. (1994).

2.1.2. Zinc en las plantas

Las plantas requieren de un equilibrio adecuado de este mineral para el crecimiento normal y el rendimiento óptimo, y su deficiencia provoca la disminución de la calidad en muchos cultivos agrícolas (Sadeghzadeh, 2013) y un menor rendimiento (Magen, 2008).

La deficiencia de Zn en suelos y plantas es un problema global reportado en muchos países (Sillanpaa, 1982; Alloway, 2004). La baja solubilidad del Zn en los suelos, y no su baja cantidad total, es la principal razón de la existencia generalizada del problema de deficiencia de Zn en las plantas de cultivo. La Figura 1.3. muestra la distribución global de las regiones donde se ha reportado el problema de deficiencia de Zn en las plantas cultivadas. Posiblemente, hay muchas otras regiones o países donde el problema de deficiencia de Zn no ha sido todavía diagnosticado.

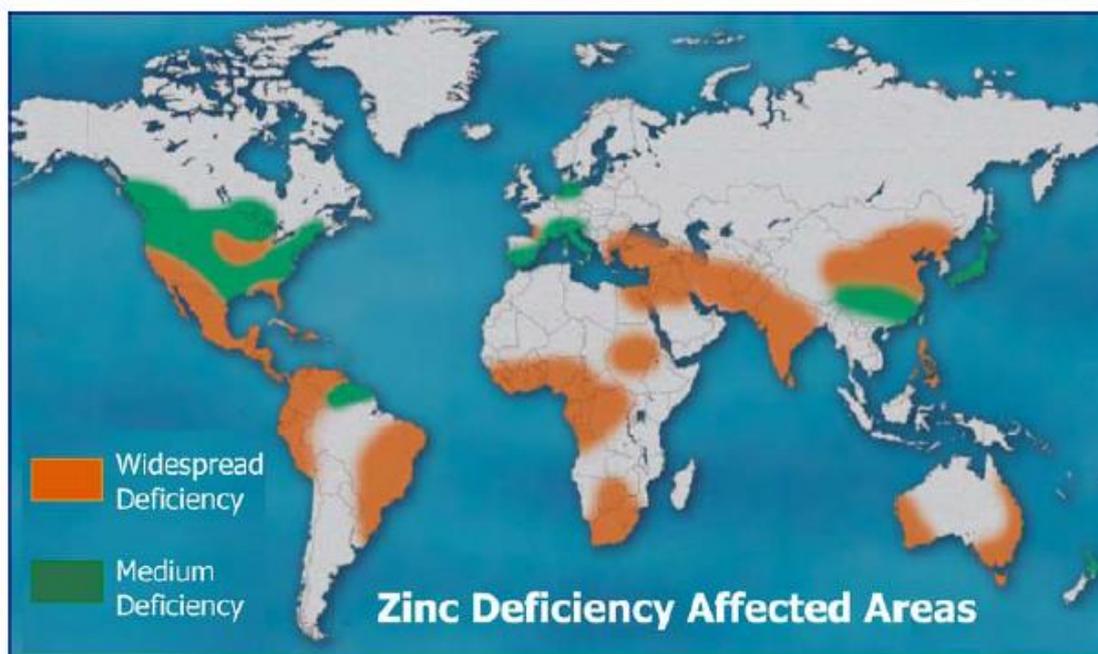


FIGURA 2.3. Distribución global de las zonas afectadas por la carencia de Zn. Fuente: Alloway (2004).

La mejora de Zn en el estado nutricional de las plantas puede proporcionar beneficios adicionales para la producción de cultivos y para la nutrición humana. El aumento de la concentración de Zn en las semillas o granos contribuye también en gran medida a mejorar la viabilidad de las semillas, vigor de las plántulas y de pie establecimiento en condiciones marginales (Cakmak et al., 2008; Harris et al., 2007). En los cultivos de trigo y maíz se ha demostrado que las plantas emergen a partir de semillas

con baja concentración de Zn tienen poco vigor de las plántulas y el rendimiento reducido (Yizmaz, 1998; Harris et al., 2007). El alto contenido de Zn en la semilla mejora la tolerancia de las plantas a diversos factores de estrés ambientales durante las etapas tempranas de crecimiento y reduce la densidad de siembra requerida (Fig. 1.4.)

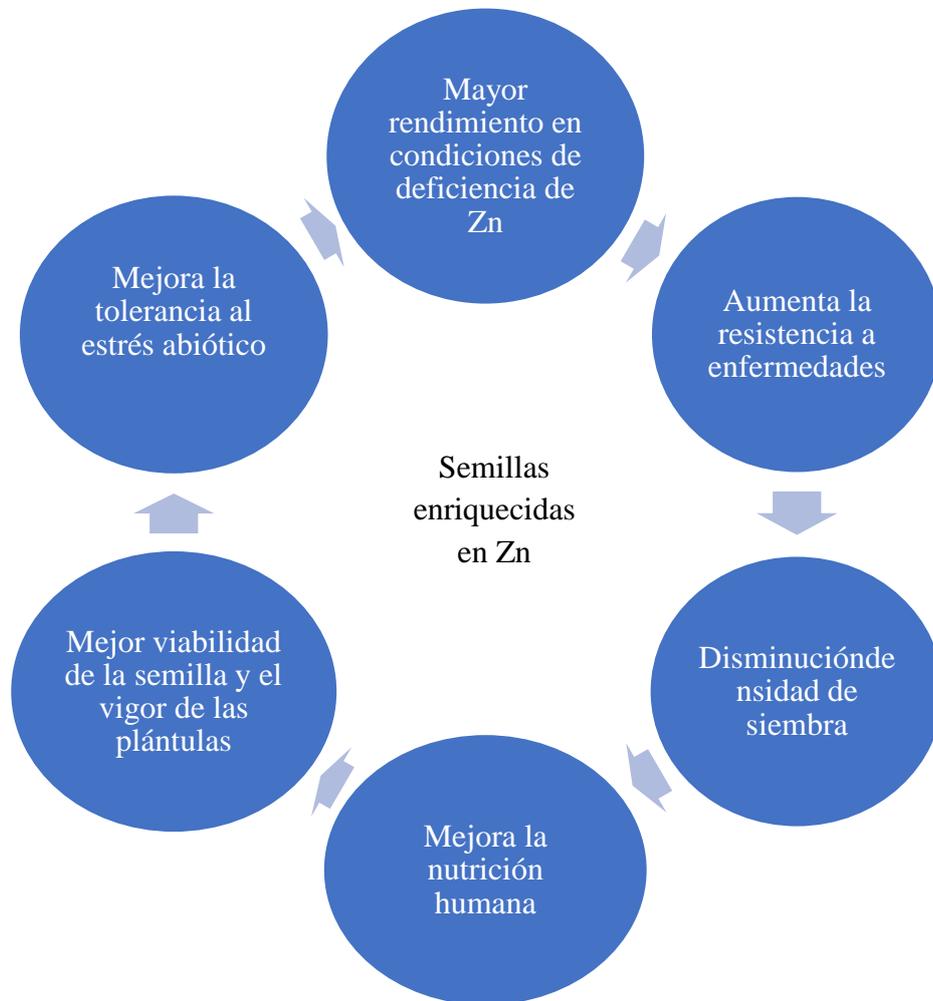


FIGURA 2.4. Beneficios nutricionales, agronómicos y humanos resultantes del uso de semillas enriquecidas en Zn. Fuente: Cakmak et al., 2008.

2.1.3. Zinc en los animales.

El Zn no tiene en el organismo un tejido de reserva de fácil acceso y es por eso que si se produce escasez en el pastoreo, los mecanismos corporales de regulación no funcionan, como sucede con otros elementos, y ocurre la deficiencia de Zn (Mufarrege y Aguilar, 2001).

La deficiencia de Zn produce en el vacuno, y en todas las especies animales, una severa inapetencia, falta de crecimiento y perjuicios en la función reproductiva, especialmente en el macho (Mufarrege y Aguilar, 2001; Rosa et al., 2008).

En las ovejas, una deficiencia de Zn provoca abortos, anorexia, apetito depravado (comen lana), reducción de la conversión de los alimentos y reducción del crecimiento; tumefacción de los tarsos, piel roja y rugosa, paraqueratosis de la piel sobre la pezuña y alrededor de los ojos además de debilitar el sistema inmunológico (Pechin, 1999; Mufarrege y Aguilar, 2001).

En los cerdos, la adecuada ingesta en Zn tiene efecto directo sobre el crecimiento, post-destete de los lechones y sobre las características seminales del verraco, mejorando su productividad y calidad (Wilt y Carlson, 2009), además de mejorar su sistema inmunológico.

El Zn se elimina principalmente por heces, y en algunas regiones del planeta, los vacunos y ovinos pierden cantidades considerables por el sudor, lo que puede provocar síntomas de deficiencia aguda (Mufarrege y Aguilar, 2001).

2.1.4. Zinc en el ser humano.

Su deficiencia acarrea depresión del sistema inmune, cardiopatías, asma, epilepsia, retraso del crecimiento, infertilidad, aumento en la incidencia de sufrir ciertos tipos de cáncer, etc., y la muerte en los casos más graves (Alloway, 2008; Levenson y Morris, 2011). A pesar de todo ello se ha estimado que sobre un 30% de la población mundial es deficiente en Zn, incluyendo alrededor del 10% de España y Portugal (Hotz y Brown 2004; OMS 2009), al que le une el efecto negativo de los fitatos que lo inmovilizan para su asimilación por el organismo.

Esta situación se atribuye principalmente a la ingesta de productos cultivados en áreas con baja fitodisponibilidad en estos minerales. En estudios previos de Gómez-Coronado et al. (2006) se han encontrado en el Suroeste de la Península Ibérica niveles de Zn inferiores a $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ en Zn-DTPA, al igual que Smith et al. (2005) encontraron en diferentes zonas de Reino Unido suelos con concentraciones insuficientes para producir cultivos con cantidades adecuadas de Zn (Alloway, 2009).

2.2. Necesidades de ingesta: Principales problemas.

La ingesta diaria recomendada (RDI) de Zn en Europa para los seres humanos es de 15 mg día Zn⁻¹ (National Research Council, 2001; Elmadfa, 2009). Una ingesta deficiente de Zn por los seres humanos se asocia graves complicaciones de salud, incluyendo deterioros de crecimiento físico, el sistema inmune y capacidad de aprendizaje, combinado con un mayor riesgo de infecciones, daños en el ADN y desarrollo del cáncer (Hotz y Brown, 2004; Levenson y Morris, 2011). No obstante, de un cuarto a un tercio de la población mundial está en riesgo de presentar una deficiencia de Zn. De hecho, la deficiencia de Zn es el quinto factor clave de enfermedad en el mundo desarrollado y aunque puede estar asociada a diversas patologías (Prasad, 2003) o tras cirugías, la hipozinemia es normalmente una deficiencia nutricional. Las poblaciones que consumen dietas basadas en plantas pobres en Zn biodisponible presentan frecuentes deficiencias de zinc (Sandstead et al., 1991).

Este es un dato que depende del país, oscilando del 4 al 73% de la población (Maret y Sandstead, 2006). En España, según la encuesta ENIDE, la población con riesgo de ingesta inadecuada de Zn, en relación a los requerimientos medios estimados, se observa que es del 1,5% al 2,7% en mujeres y del 15 y el 30% en hombres. Sin embargo, como Gómez-Coronado et al. (2016) han revisado, la ingesta de alrededor del 56% de la población española está por debajo de los dos tercios de la dosis diaria recomendada (Sánchez et al., 2009), principalmente en los ancianos institucionalizados (Mensink et al., 2013). Así, de acuerdo con estos valores, la ingesta diaria de Zn, especialmente en la población mayor, se debe aumentar para alcanzar los valores recomendados.

2.3. Estrategias de remediación.

Para aumentar la ingesta diaria de Zn a los niveles recomendados, existen diferentes estrategias (Hotz y Brown, 2004; White y Broadley, 2005; Cakmak, 2008; Velu et al., 2013), siendo la más recomendada el consumo de una dieta diversificada. Sin embargo, en ciertos países como se ha comentado en el capítulo anterior, esto no es suficiente para alcanzar el nivel objetivo, como en la población más anciana en España y Portugal (Ortega

et al., 1997, Terrés et al., 2001; Sánchez et al., 2009; Mensink et al., 2013) debido, entre otras causas, a un menor consumo de carne (Sánchez et al., 2009). Se ha considerado el enriquecimiento de los alimentos durante su procesado o la suplementación con Zn, pero este enfoque requiere de un desembolso financiero continuo y no es accesible a todos los niveles socioeconómicos de la población (Bouis et al., 2011).

2.3.1. Biofortificación

Autores como Cakmak (2008) consideran que la mejor alternativa sería la de aumentar la concentración de Zn en las partes comestibles de los cultivos de alimentos básicos mediante el fitomejoramiento (biofortificación genética). Esta opción representa una estrategia rentable y ampliamente aceptada (Cakmak, 2008). Hay avances muy prometedores en la reproducción de genotipos de cereales biofortificados de Zn, especialmente a través del programa HarvestPlus. Sin embargo, el logro de concentraciones de Zn suficientemente altas en los granos para la nutrición humana está directamente relacionado con la solubilidad química del Zn en los suelos (Cakmak, 2008). La biofortificación genética es una estrategia que utiliza técnicas de fitomejoramiento para producir cultivos de alimentos básicos con mayores niveles de micronutrientes (Bouis, 2003). Ofrece una solución sostenible a los problemas de desnutrición al explorar la variación genética natural para desarrollar variedades de cultivos densos en minerales (Pfeiffer and McClafferty, 2007). Los fitomejoradores examinan las cesiones existentes en los bancos mundiales de germoplasma para determinar si existe variación genética para reproducirse para un rasgo en particular. Luego crían selectivamente cultivares nutritivos de los principales alimentos básicos, ricos en concentraciones de Zn y hierro (Fe) y con sustancias que promueven su biodisponibilidad.

En regiones con una baja solubilidad de Zn en el suelo, el enfoque de mejoramiento vegetal puede depender de la aplicación de fertilizantes que contengan Zn, por tanto, de la denominada biofortificación agronómica, la cual, consiste en adicionar fertilizantes para incrementar la concentración de minerales en la planta y se ha demostrado gran eficacia para paliar dichas deficiencias. (White y Broadley, 2005; Cakmak, 2008; Alloway, 2009). Esta técnica ha demostrado ser una solución rápida y eficaz para aumentar la concentración

de Zn en numerosos cultivos, principalmente cereales (Cakmak et al., 2010b; Phattarakul et al., 2012; Zou et al., 2012) y leguminosas (Poblaciones y Rengel, 2017).

Las estrategias de fertilización también pueden proporcionar una opción inmediata y efectiva para aumentar la concentración de Zn y su productividad en muchos cultivos, particularmente en suelos con Zn severo, incluso pueden combinarse con otros agroquímicos, por ejemplo, el uso de fertilizantes que contienen Zn para la aplicación en el suelo y la aplicación foliar de Zn se hará factible al mismo tiempo que se combinan con herbicidas y fungicidas, para reducir los costos económicos y de tiempo. La creación de conciencia entre los agricultores de escasos recursos en el mundo en desarrollo mejorará aún más la adopción de procedimientos eficaces de aplicación del Zn.

En estudios realizados por Yilmaz et al. (1997), han comprobado que dependiendo de las condiciones del suelo y de la forma de aplicación, los fertilizantes de Zn pueden aumentar la concentración de Zn en diferentes cultivos hasta cuatro veces en condiciones de campo.

El objetivo de este documento es evaluar el papel potencial de la estrategia de fertilización con Zn (biofortificación agronómica) en el aumento de la concentración de Zn en el cultivo del brócoli.

Se dispone de un gran número de estudios sobre la fertilización con Zn aplicados en el suelo y foliares en la corrección de deficiencia de Zn y aumento del crecimiento y rendimiento de las plantas (Martens y Westermann, 1991; Mortvedt y Gilkes, 1993; Rengel et al., 1999). El Zn puede ser aplicado al suelo como compuesto orgánico e inorgánico. El sulfato de Zn ($ZnSO_4$) es la fuente inorgánica más aplicada a suelos en forma de ZnO, ZnEDTA y Zn-oxisulfato. La eficacia agronómica (por ejemplo, la magnitud de la respuesta del cultivo por unidad de micronutriente aplicado) de los fertilizantes para fertirrigación de Zn es mayor con Zn-EDTA que con los fertilizantes inorgánicos (Martens y Westermann, 1991; Mortvedt, 1991).

2.3.2. Combinación de biofortificación genética y agronómica

Para aumentar la ingesta diaria de Zn y aproximarla a los niveles RDI y mejorar su biodisponibilidad, en suelos con baja disponibilidad química en Zn, la combinación de la

biofortificación genética y agronómica se considera que es la estrategia sostenible y rentable a largo plazo (Alloway, 2009; Joy et al., 2015; Gómez-Coronado et al., 2016). Esta combinación ofrece soluciones sostenibles a los crecientes problemas de desnutrición relacionados con los micronutrientes. Los enfoques genéticos y agronómicos no son en realidad soluciones separadas; son complementarios y sinérgicos.

Según estudios realizados por Velu et al. en 2014, la combinación de la estrategia de fertilización y biofortificación genética maximizará el enriquecimiento de los cultivos alimentarios con micronutrientes.

En cultivos como los cereales (Cakmak et al., 2010; Ghasemi et al., 2013; Gómez Coronado et al., 2016) y las leguminosas (Ibrahim y Romadán, 2015; Gómez-Coronado et al., 2016) se ha demostrado que la aplicación foliar de Zn aumenta efectivamente la concentración de Zn en el grano (Hussain et al., 2012; Gomez-Coronado et al., 2016; Poblaciones y Rengel, 2017) y la aplicación en el suelo aumenta el rendimiento del grano pero no es efectiva en la acumulación de Zn en el grano. Por lo tanto, la combinación de aplicaciones en el suelo y foliares parece ser el método más efectivo para aumentar tanto en el Zn de grano como el rendimiento de grano (Cakmak et al., 2010; Gomez-Coronado et al., 2016).

La aplicación foliar de Zn, sola o en combinación con la aplicación de Zn en el suelo, es la técnica más eficaz para aumentar significativamente el contenido de Zn en el grano de trigo, tanto en suelos suficientes como deficientes en Zn (Cakmak et al., 2010; Zhang et al., 2012; Zou et al., 2012). De hecho, estudios previos han demostrado que la aplicación foliar de Zn es efectiva disminuyendo la proporción de fitato y aumentando la biodisponibilidad estimada de Zn (Zou et al., 2012; Gómez-Coronado et al., 2016). Por otro lado, el nitrógeno (N), es una de las principales prácticas agrícolas en la producción de cultivos, y parece ser una estrategia agronómica prometedora para la biofortificación con Zn. Algunos estudios mostraron que un suministro adecuado de N podría mejorar eficazmente la acumulación de Zn en los granos de trigo (Xue et al., 2012; Guo et al., 2013). Este efecto depende de una disponibilidad suficiente de Zn y se ve reforzado por un suministro elevado de Zn (Kutman et al., 2011; Guo et al., 2013). Este efecto beneficioso está relacionado con el hecho de que el suministro de cantidades suficientes de N aumenta el contenido de proteína de grano, que está positivamente correlacionado con el contenido de Zn de grano (Zhao et al., 2009; Erenoglu et al., 2011). La mayoría de los estudios que

evaluaron la relación entre la nutrición con N y la acumulación de Zn en los granos se llevaron a cabo en condiciones hidropónicas o de invernadero y normalmente utilizando un solo genotipo.

Se dispone de poca información sobre los efectos combinados sobre los diferentes genotipos de trigo panificable de la aplicación foliar combinada de N y Zn. Además, establecer si la aplicación combinada de urea con un tratamiento foliar de Zn podría reemplazar las dos aplicaciones foliares tradicionales de Zn podría ser económicamente interesante, ya que el fertilizante de Zn es más caro que la urea.

2.4. El cultivo del brócoli

La familia botánica de las brassicáceas se considera nativa del Asia Occidental y Europa. Tienen un ancestro común en una planta silvestre del Mediterráneo o del Asia Menor que fue llevada a las peñas calcáreas de Inglaterra, a las costas de Dinamarca, Holanda, Francia, España y Grecia. Las plantas originarias todavía crecen de forma silvestre a lo largo de las costas del Mediterráneo, Gran Bretaña y del sudoeste de Europa. Estas especies, por selección natural o mutación, han dado origen a las especies que se cultivan actualmente (Jaramillo et al., 2006).

El brócoli, bróculi o brécol pertenece a la familia Brassicaceae, siendo su nombre científico *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.

Su clasificación taxonómica más correcta es:

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Brassicales*

Familia: *Brassicaceae*

Género: *Brassica*

Especie: *oleracea* L.

Variedad: *italica*

Nombre científico: *Brassica oleracea* L. var. *Itálica* Plenck

Nombre común: Brócoli, brécol.

El brócoli es una planta herbácea, anual, que posee una raíz pivotante de la que parten muchas raíces secundarias superficiales. Tiene un tallo corto, erecto, que termina en una masa globosa de yemas florales hipertrofiadas en los laterales y en las axilas de las hojas. Así mismo, puede desarrollar brotes de yemas florales, de tamaño menor que el de la cabeza principal, que aparecen de forma paulatina y escalonada, generalmente tras el corte del cogollo principal. Las masas de pellas, inflorescencias, son de color verdoso, grisáceo o morado, con diferente grado de compactación según cultivares. (Maroto et al., 2007).

2.4.1. Importancia económica del cultivo del brócoli

La producción mundial de brócoli en 2016 ascendió a 25 millones de toneladas, con una superficie de 1,3 millones de ha, siendo Europa sólo responsable de aproximadamente un 9% de la producción mundial con 2,3 millones de t y una superficie cultivada de 176 000 ha (FAO, 2016).

El brócoli se introdujo en España en los años 70. Inicialmente se cultivó en la Comunidad Valenciana y Cataluña, posteriormente el cultivo se extendió a otras regiones españolas como Murcia, Andalucía, en fases más tardías es posible encontrarlo en regiones como Extremadura, Rioja, Navarra, Aragón, Castilla La Mancha (Maroto, 1995). Ha aumentado durante los últimos años tanto en producción como en consumo, debido principalmente a su alto valor nutricional. Los países más consumidores son: Reino Unido, Francia y Holanda, que reciben un 65% del total de la producción española. En nuestro país no está muy extendido el consumo, aunque se está introduciendo de manera importante en los últimos años (Rodríguez Hernández, 2013).

A día de hoy, en España, el cultivo de brócoli adquiere especial importancia en el Sureste, desde donde se distribuye al resto de la Península y al extranjero. El clima templado mediterráneo resulta óptimo para su cultivo, y en la actualidad, con la introducción de nuevas variedades, se persigue poder producir brócoli todo el año (Proexport, 2012).

En el año 2017, la producción de brócoli representó el 3,5% de las hortalizas cosechadas en España, donde se observa una tendencia positiva desde 2004, con una tasa

de crecimiento anual constante y entorno al 3%. La producción se destina en un 56% a su venta en consumo en fresco, un 43% a productos transformados, y el resto para alimentación animal (Mapama, 2017). Concretamente, la superficie cultivada fue de 32 867 ha y la producción de 541 448 t, siendo las principales Comunidades Autónomas productoras de brócoli Murcia, Navarra, Extremadura, Andalucía, Comunidad Valenciana y Castilla La Mancha (Mapama, 2017).

Extremadura es la tercera Comunidad Autónoma, por detrás de Murcia y Navarra, en cuanto a producción de brócoli. La producción en 2017 fue de 67 857 t y la superficie cultivada 5 135 ha. El 99% de las hectáreas cultivadas en Extremadura pertenecen a la provincia de Badajoz, además en el 100% de la superficie del cultivo se lleva a cabo al aire libre y en regadío (Mapama, 2017).

En Extremadura, su producción en los últimos 10 años, ha pasado de 2.000 ha a las más de 5.000 ha que se cultivan actualmente en la región, cuya exportación, principalmente congelado, es a países como Portugal, Alemania, o Reino Unido (MAPAMA, 2017). Su gran auge se ha debido en gran medida a que su ciclo de otoño-invierno permite rotarlo con cultivos de verano tan importantes en nuestra región como el tomate (con más de 16.000 ha) y el maíz (con más de 70.000 ha), lo que promete una expansión todavía mucho mayor.

2.4.2. Calidad nutritiva del brócoli

Los resultados de investigaciones recientes han reafirmado claramente la importancia de frutas y verduras, muy probablemente la fuente más rica de antioxidantes, enfatizando la necesidad de aumentar la proporción de estos productos en una dieta. Los mejores antioxidantes vegetales son las vitaminas C y E, carotenoides y compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides (Sikora et al., 2008). Las brassicas comunes desempeñan un papel importante en el suministro de los seres humanos con estos nutrientes. Contienen varios compuestos bioactivos, por lo tanto, actúan como antioxidantes, pero también demuestran otras propiedades promotoras de la salud (Moreno et al., 2006).

Las brassicas son una excelente fuente dietética de fitoquímicos, como glucosinolatos (GLS) (β -tioglucósido-N-hidroxi-sulfatos), que han demostrado actividad

contra el cáncer, compuestos fenólicos y otros antioxidantes incluidas las vitaminas (C, K1, etc.) y nutrientes minerales esenciales (Ca, Mg, Na, C, K, Fe, Zn, etc.) (Moreno et al., 2006). Los beneficios para la salud de brócoli se asocian en parte con compuestos secundarios de plantas conocidos por su actividad antioxidante (Jones et al., 2006). Los componentes predominantes de brócoli son los GLS que están presentes en todos los miembros de la familia Brassicaceae. El contenido GLS es extremadamente variable según las especies (Verkerk et al., 2009), la variedad (Sivakumar et al., 2007), parte de la parte vegetal de la planta (Borowski et al., 2008), periodo de vegetación (Turhan et al., 2011) y otros factores (por ejemplo, la fertilización y las condiciones climáticas). También destaca por su contenido en Vitamina C (ácido ascórbico), antioxidante muy eficaz debido a sus propiedades. Su contenido depende de varios factores como son especie y variedad (Valšíkova et al., 2010), el modo de procesamiento y el tratamiento poscosecha antes del almacenamiento (Nursal Tosun y Yucean, 2007).

El brócoli es una buena fuente de los principales elementos minerales, como Na, K, Ca, Mg, Cl, P, S, Fe, Zn, Mn y Cu, que son esenciales para los seres humanos (House, 1999). El brócoli es una fuente particularmente buena de Ca y Mg, y los estudios han demostrado que el brócoli es una fuente alternativa importante de Ca en los segmentos de la población que consumen cantidades limitadas de productos lácteos (Farnham et al., 2000). Es importante para la salud humana que las verduras contengan compuestos que promuevan la salud, y que además estén libres de sustancias tóxicas como metales pesados.

En la tabla 1.1. se detalla la composición nutritiva del brócoli.

TABLA 2.1. Composición nutricional del brócoli en 100 gramos de porción comestible.

COMPUESTO	CANTIDAD POR CADA 100 gramos
Agua (%)	89,92
Ceniza (%)	0,26
Energía (Cal)	42
Proteína (g)	5,45

	Lípidos (g)	0,30
	Grasa (g)	0,30
	Glucósidos (g)	4,86
	Glúcidos (g)	3,70
	Fibra (g)	1,90
Minerales	Calcio (mg)	130
	Hierro (mg)	1,3
	Fósforo (mg)	76
	Potasio (mg)	355
	Sodio (mg)	26
	Zinc (mg)	0,38
	Magnesio (mg)	24
	Cobre (mg)	0,043
	Manganeso (mg)	0,218
	Vitaminas	A (U.I.)
B1 Tiamina (mg)		100
B2 Riboflavina (mg)		210
B3 Niacina (mg)		0,90
B6 (mg)		0,143

C Ac. Ascórbico (mg)	118
-------------------------	-----

Fuente: Jaramillo et al. (2006).

2.4.3. Experiencias previas en biofortificación agronómica en el género Brassica

Los cultivos como los del género Brassica no han recibido tanta atención a pesar de que se encuentran entre los diez vegetales más importantes económicamente (Francisco et al., 2017) y son una excelente fuente dietética de los principales elementos minerales y oligoelementos, vitaminas y otros compuestos orgánicos (House, 1999; Moreno et al., 2006; Thomson et al., 2007). En Extremadura, el cultivo del brócoli ha sufrido una gran expansión y un gran auge debido a la posibilidad de rotarlo con cultivos de verano como pueden ser el tomate o el maíz. En el brócoli encontraron una concentración de Zn en coles y brócoli de 21 mg Zn kg⁻¹ (Ogdebe et al., 2015; Slosar et al., 2017). Katuzewicz et al. (2016) encontraron cantidades relativamente grandes de Zn en diez genotipos diferentes de brócoli, entre 42 y 66 mg Zn kg⁻¹, superiores al nivel objetivo para los cereales establecido en 38 mg Zn kg⁻¹ por el programa HarvestPlus (www.harvestplus.org) y cercano al establecido en 61 mg Zn kg⁻¹ en los guisantes de campo por Huett et al (1997). Sin embargo, el efecto de la aplicación de Zn en el brócoli ha sido escasamente estudiado. Recientemente Slosar et al. (2017) encontraron aumentos entre el 10 y el 15% debido a una aplicación foliar de sólo 375 y 750 g de Zn ha⁻¹. White et al (2018) establecieron entre 117 y 1666 mg de Zn kg⁻¹ la concentración crítica de Zn en los brotes como límite comercial para la biofortificación de Zn sin pérdida del rendimiento de los cultivos, pero aún se desconoce cómo la biofortificación de Zn puede afectar la absorción y posterior acumulación en el brócoli.

La concentración de Zn total en el alimento no es el único parámetro importante, sino que también su biodisponibilidad es crucial para alcanzar los valores de ingesta recomendados. El fitato, también conocido como hexacofosfato de inositol, es un compuesto que contiene fósforo. Se considera un antinutriente importante porque su presencia está asociada a una menor absorción de minerales debido a la estructura del fitato, que tiene una alta densidad de grupos de fosfatos cargados negativamente que forman complejos muy estables con iones minerales (principalmente Ca, Fe, Mg y Zn) que causan indisponibilidad para la absorción intestinal (López et al., 2002; Walter et al., 2002;

Bohn et al., 2008; Norhaizan y Faizadatul, 2009; Gupta et al., 2015). Por lo tanto, los alimentos derivados de plantas con una alta concentración de fitatos también pueden causar desnutrición, siendo una meta su reducción en las partes comestibles de los alimentos. Experimentos recientes han demostrado un efecto positivo de la aplicación foliar del Zn, que disminuye las concentraciones de fitato en cultivos como el trigo (Hussain et al., 2012; Ghasemi et al., 2013) y los guisantes de campo (Poblaciones y Rengel, 2017). El procesamiento es otro factor a tener en cuenta, ya que se encontró una reducción en las concentraciones de Zn y fitato después de los guisantes de campo congelados e hirviendo por Brigide et al. (2014) y Poblaciones y Rengel (2017) y Wang et al. (2009) en lentejas.

En estudios realizados por Rivera Martín (pendiente de publicación), se ha comprobado que la altura de la planta y los diámetros más altos y más bajos de las flores fueron significativamente más altos en todas las aplicaciones de Zn pero sin embargo, ni el peso de la planta ni el de las flores se vieron afectados positivamente. La aplicación foliar de Zn produjo una acumulación significativamente mayor de Zn, alcanzando concentraciones de Zn hasta 11 veces mayor en el tallo y hojas tratadas por vía foliar, aproximadamente 1,7 veces más en los ramilletes y aproximadamente 2,2 veces más en los ramilletes hervidos. El Ca total, Na, Mg, Mn y Zn fueron significativamente más altos en el tallo y hojas, y el K, P, S, Cu, Fe y Se totales fueron significativamente más altos en la floración cruda, disminuyendo durante la ebullición, en promedio, alrededor del 19%, pero con una mayor biodisponibilidad debido a una disminución en la concentración de ácido fítico, lo que demuestra que el brócoli entero podría constituir una buena fuente nutricional para los animales y los humanos.

El proyecto que se plantea pretende estudiar la eficacia de la biofortificación, tanto con Zn como con nitrógeno (N), en el brócoli. Nutricionalmente es muy interesante ya que contiene una elevada concentración de minerales esenciales para la nutrición humana (House, 1999; Farnham et al., 2000), por la presencia de vitamina C, polifenoles y antioxidantes que las hacen recomendables debido a los numerosos beneficios para la salud de estos compuestos (Vallejo et al., 2002).

CAPÍTULO 3
OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación es estudiar la eficacia de la aplicación combinada de Zn y N sobre:

- La toma y posterior acumulación de Zn en pellas, hojas y tallo.
- El ciclo de crecimiento, rendimiento y componentes del mismo, así como sobre los principales parámetros de calidad: contenido en proteína, fibra y composición mineral (Ca, Fe, Mg y Se).

Estudio del efecto del procesado de pellas y hojas sobre la composición mineral.

CAPÍTULO 4
MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Localización del proyecto

El presente ensayo se ha llevado a cabo en la Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura, Badajoz, España ($38^{\circ} 89' N$, $6^{\circ} 97' W$, 186 m sobre el nivel del mar), en el invernadero iluminado de forma natural.



FIGURA 4.1. Localización del ensayo. Fuente: Google maps.

4.2. Recogida del suelo y determinación de sus principales características

En la zona de Tierra de Barros, en el Oeste de España ($38^{\circ} 88' N$, $7^{\circ} 04' W$), se recogieron suelos arenosos con deficiencia de Zn. El suelo se secó al aire libre, se tamizó a 2 mm y se utilizaron cuatro submuestras para determinar los siguientes parámetros:

- pH. $6,5 \pm 0,1$, utilizando un medidor de pH calibrado (10 g de suelo: 25 mL de H_2O desionizado).

- Materia orgánica $2,8 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$, por el método Walkley y Black (1947) mediante oxidación con dicromato y determinación colorimétrica.
- Fósforo disponible 15 mg kg^{-1} , utilizando el método Olsen (1954).
- Potasio $< 15 \text{ mg kg}^{-1}$, nitrógeno nítrico $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ y nitrógeno amónico $2,7 \text{ mg kg}^{-1}$ se extrajeron con cloruro de potasio 1 M durante 1 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y se midieron en un analizador de inyección de flujo de Lachat.

El Zn disponible para las plantas fue de $0,38 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$. El Zn-DTPA se determinó siguiendo el método de Lindsay y Norvell (1978) por extracción con DTPA (ácido dietilentriamina pentaacético) y el Zn del extracto se determinó mediante espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), como se describe a continuación para las muestras de grano. Se incluyeron dos blancos en cada lote de muestras. Todos los resultados fueron reportados en base a peso seco.

Las semillas utilizadas fueron Green Top, se esterilizaron superficialmente mediante remojo en etanol al 80% v/v durante 60 segundos, se lavaron a fondo con agua destilada y se sembraron en un semillero que contenía sustrato comercial y permanecieron allí durante 4 semanas. Antes del trasplante en macetas de 30 cm de alto y 30 cm de ancho con 8,5 kg de tierra (una planta por maceta) y para asegurar que el Zn fuera el único nutriente que limitaba el crecimiento, se añadieron los siguientes nutrientes basales en mg kg^{-1} al suelo como soluciones: 90,2 KH_2PO_4 ; 139,9 K_2SO_4 ; 40,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 95,2 NH_4NO_3 ; 150,3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10,0 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,0 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,7 H_3BO_3 . Los tratamientos de Zn consistieron en la aplicación de una solución de sulfato de Zn heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a la superficie del suelo. Después de la aplicación de nutrientes basales y de las diferentes dosis de Zn en el suelo, el suelo de cada maceta se mezcló vigorosamente a mano. Se realizó una aplicación extra de 95,2 NH_4NO_3 cada 4 semanas para evitar deficiencia de N.

4.3. Diseño experimental

Con el objetivo de estudiar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de Zn en diferentes momentos y en combinación o no con nitrógeno, se diseñó un experimento completamente aleatorio con cuatro repeticiones. Concretamente los tratamientos fueron:

1. Tratamiento control (C), sin aplicación de Zn ni N.
2. Tratamiento foliar de 15 ml 0,5% de s/v de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en el momento de aparición de la pella ($0,5\text{M}_1$)
3. Tratamiento foliar de 15 ml 0,5% de s/v de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a las dos semanas de aparición de la pella ($0,5\text{M}_2$).
4. Tratamiento combinado de 15 ml 0,5% de s/v de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con un 27% de N diluido en 0,4% de nitrato amónico cálcico (NAC) en el momento de aparición de la pella ($0,5\text{M}_1\text{N}$).
5. Tratamiento combinado de 15 ml 0,5% de s/v de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con un 27% de N diluido en 0,4% de nitrato amónico cálcico (NAC) a las dos semanas de aparición de la pella ($0,5\text{M}_2\text{N}$).
6. Tratamiento foliar de 15 ml 0,25% de s/v de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ aplicado en dos momentos, en la aparición de la pella y a las dos semanas ($0,25\text{M}_1+0,25\text{M}_2$).
7. Tratamiento combinada de 15 ml 0,25% de s/v de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con un 27% de N diluido en 0,4% de nitrato amónico cálcico (NAC) aplicado en dos momentos, en la aparición de la pella y a las dos semanas ($0,25\text{M}_1\text{N}+0,25\text{M}_2\text{N}$).

Los tratamientos se aplicaron al final de la tarde mediante fumigación continua hasta que todas las hojas se mojaron. Las macetas se cubrieron con polietileno en la base de las plantas para que la solución no se filtrara al suelo. Se añadió un mojante, **Jabónfos**, para que la solución quedara adherida a las hojas. El contenido de humedad del suelo se mantuvo en torno al 60% de la capacidad de retención de agua, regando las plantas cada dos días con agua destilada. No hubo incidencia de plagas o enfermedades durante el estudio.

4.3.1. Determinaciones en plantas y suelo

Las plantas cuando ya tenían su madurez se recolectaron a finales de febrero (12 semanas después del trasplante) y se lavaron cuidadosamente a mano con agua destilada. Antes de la cosecha se tomaron cuatro muestras de tierra de cada maceta para determinar el Zn disponible (Zn-DTPA) para la planta. Se pesó la planta entera y se midió su altura, posteriormente, se pesó, por un lado, las hojas separadas del tallo y se cortaron en pequeñas secciones para proceder a su liofilización y así poder conservarla, y por otro lado, se midió la altura y se pesó el tallo, se midió su diámetro y se cortó en pequeñas secciones al igual que las hojas para después liofilizarlos. Por último la pella también se pesó y se midió su altura, su diámetro mayor (D), su diámetro menor (d) y su relación D/d.

4.3.2. Análisis de Zn, Ca, Fe y Mg

Se midieron las concentraciones de Zn así como de Ca, Mg y Fe en el tallo, las hojas y la pella y en el suelo disponible para las plantas. Se pesaron 20 mg de materia seca de las muestras molidas y fueron digeridas mediante un sistema de microondas compuesto por una plataforma Multiwave 3000 con un rotor MF50 DE 48 recipientes (Anton Para GmbH, Graz, Austria); los recipientes de digestión eran tubos de perfluoroalcoxicidad (PFA) en camisas de presión de polietilmetilacetona (PEEK) (Anton Para GmbH). Las muestras fueron digeridas en 2 ml 70% de ácido nítrico ultrapuro HNO₃, 1 mL de agua Milli-Q (18,2 MΩ cm; Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK), y 1 mL de H₂O₂. Se incluyeron dos muestras en blanco operativos en cada proceso de digestión. Se incluyeron muestras duplicadas de un material de referencia certificado (CRM: hoja de tomate SRM 1573a NIST, Gaithersburg, MD, EE.UU.) cada cuatro digestiones. Se utilizó un material de referencia de laboratorio (LRM), Paragon, para cada proceso de digestión. Después de la digestión, cada tubo se enrasó a un volumen final de 15 mL añadiendo 11 mL de agua Milli-Q, luego se transfirió a un tubo universal de 25 mL (Sarstedt Ltd., Nümbrecht, Alemania) y se almacenó a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron 1:5 con agua Milli-Q en tubos de 13 mL (Sarstedt Ltd.) antes del análisis.

Las muestras de plantas y las concentraciones de Zn biodisponible para las plantas y los otros tres elementos (Ca, Fe y Mg) fueron determinadas por ICP-MS (Thermo Fisher Scientific iCAPQ, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania).

Se utilizaron patrones de calibración externos de varios elementos (Claritas-PPT grado CLMS-2; SPEX Certiprep Inc., Metuchen, NJ, EE.UU.) que incluían Ca, Mg y Fe en el rango 0-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0, 20, 40, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Se utilizó una solución de calibración externa de elementos múltiples (PlasmaCAL, SCP Science, Courtaboeuf, Francia) para crear patrones de Ca y Mg en el rango de 0-30 mg l^{-1} . El procesamiento de las muestras se llevó a cabo utilizando el software Qtegra™ (Thermo Fisher Scientific) con una calibración cruzada externa entre los modos de conteo de pulsos y el detector analógico cuando fue necesario. La recuperación específica de Zn de los CRMs fue del 95% en comparación con los valores de CRM certificados.

4.4. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a una ANOVA de dos vías, incluyendo la “parte de brócoli” (tallos, hojas y pella), “tratamientos con Zn”, así como su interacción en el modelo. Cuando se encontraron diferencias significativas en el ANOVA, se compararon las medias mediante la prueba de la diferencia mínima significativa protegida (LSD) de Fisher a $P < 0,05$. Las hipótesis de la normalidad y homocedasticidad fueron aseguradas por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Todos los análisis se realizaron utilizando el método Statistix v.8.10 para Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

CAPÍTULO 5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de la planta

El análisis de la varianza (ANOVA) muestra como la aplicación de los diferentes tratamientos con Zn influyó significativamente sobre el peso seco de las hojas, tallo y pella de los brócolis. Sin embargo, los demás parámetros de crecimiento estudiados no se vieron influidos por ninguna de las aplicaciones estudiadas (Tabla 5.1).

TABLA 5.1. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) de la altura de la planta, altura de la pella, diámetro mayor (D) y menor (d) de la pella, la relación entre ambos (D/d), diámetro del tallo y peso seco de hojas, tallo y pella de brócoli según el tratamiento de Zn empleado.

Fuente	G.L.	Altura planta	Altura pella	Diámetro mayor pella (D)	Diámetro menor pella (d)	D/d	Diámetro tallo	Peso seco hojas	Peso seco tallo	Peso seco pella
Zinc	6	1,15	1,26	0,79	1,22	1,3 2	0,92	8,36** *	11,20** *	3,01 *

*Significación a un 0,05 nivel de probabilidad

***Significación a un 0,001 nivel de probabilidad

Aunque ninguno de los tratamientos estudiados influyó significativamente ni en la altura de la planta ni en la de la pella si se observó, aunque de manera no significativa, un mayor crecimiento en el tratamiento 0,25+0,25, es decir, en el que se realizaron dos aplicaciones con Zn, una al aparecer la pella y otra dos semanas después, concretamente un 12,1% en cuanto a la altura de la planta y en un 23,8% en la altura de la pella (Tabla 5.2).

En cuanto al tamaño y forma de la pella, mientras que el diámetro mayor de la pella (D) osciló entre 7,5 y 8,1 cm, siendo el tratamiento 0,5M₂N un 11,2% menor que el tratamiento Control, el diámetro menor (d) lo hizo entre 6,1 y 7,3 cm, siendo en ambas un 16,8% mayor, aunque de manera no significativa, en el tratamiento Control y en el 0,5M₁N. La relación D/d más cercana a 1, es decir los brócolis con las pellas más

redondeadas, se obtuvo también en el tratamiento 0,25N+0,25N. En cuanto al diámetro del tallo, fue más fino en el tratamiento Control y en el 0,5M₂, con 1,8 cm y más grueso en el 0,25+0,25, con 2,1 cm (Tabla 5.2).

TABLA 5.2. Efecto del tratamiento de Zn sobre la altura de la planta, altura de la pella, diámetro mayor (D) y menor (d) de la pella de brócoli, la relación entre ambos (D/d) y el diámetro del tallo.

Tratamiento	Altura planta (cm)	Altura pella (cm)	Diámetro mayor pella (D) (cm)	Diámetro menor pella (d) (cm)	D/d	Diámetro tallo (cm)
Control	28,95 A	11,95A	8,08 A	7,33 A	1,10 A	1,80 A
0,5M ₁	26,65 A	12,03 A	7,50 A	6,85 A	1,09 A	1,95 A
0,5M ₂	29,65 A	13,08 A	7,50 A	6,45 A	1,16 A	1,80 A
0,5M ₁ N	29,78 A	12,70 A	8,03 A	6,95 A	1,16 A	1,98 A
0,5M ₂ N	28,18 A	11,78 A	7,18 A	6,10 A	1,18 A	2,00 A
0,25+0,25	29,88 A	14,58 A	7,50 A	6,83 A	1,10 A	2,05 A
0,25N+0,25N	28,68 A	12,13 A	7,73 A	7,33 A	1,05 A	1,98 A

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

Todos los tratamientos estudiados influyeron positivamente en el peso seco de las hojas, tallo y pella de manera significativa menos el tratamiento 0,5M₁, en el que se observó un menor peso seco en las tres partes del brócoli estudiadas. Sin embargo, el tratamiento 0,25N+0,25N fue el que provocó significativamente una mayor producción de materia seca de las hojas, tallo y pella (Figuras 5.1, 5.2 y 5.3).

Estudios previos han observado un efecto positivo de la aplicación de Zn en el suelo sobre la producción de biomasa y el rendimiento del grano tanto en cereales

(Cakmak et al., 2010; Gómez-Coronado et al., 2016) como en leguminosas (Poblaciones y Rengel, 2016). Sin embargo, la información existente sobre brassicas es más escasa. En un reciente estudio sobre biofortificación de Zn en brócoli de Rivera-Martín et al. (pendiente de publicación) si se observó, debido a la baja concentración de Zn en el suelo sobre el que se desarrolló el ensayo, un aumento en el tamaño y crecimiento de los brócolis gracias a la aplicación inicial al suelo de $5 \text{ mg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O kg}^{-1}$ de suelo. Encontraron también que la aplicación al suelo produjo una reducción en torno al 20% en el diámetro del tallo. Sin embargo, ni en el peso de las plantas ni en el de los floretes, los parámetros más importantes desde el punto de vista de los agricultores, observaron ningún tipo de efecto negativo sobre el crecimiento o producción de brócolis. White et al. (2018) por su parte, no encontraron aumentos en el peso seco de los brotes debido a la aplicación de Zn en el suelo en diferentes Brassicas.

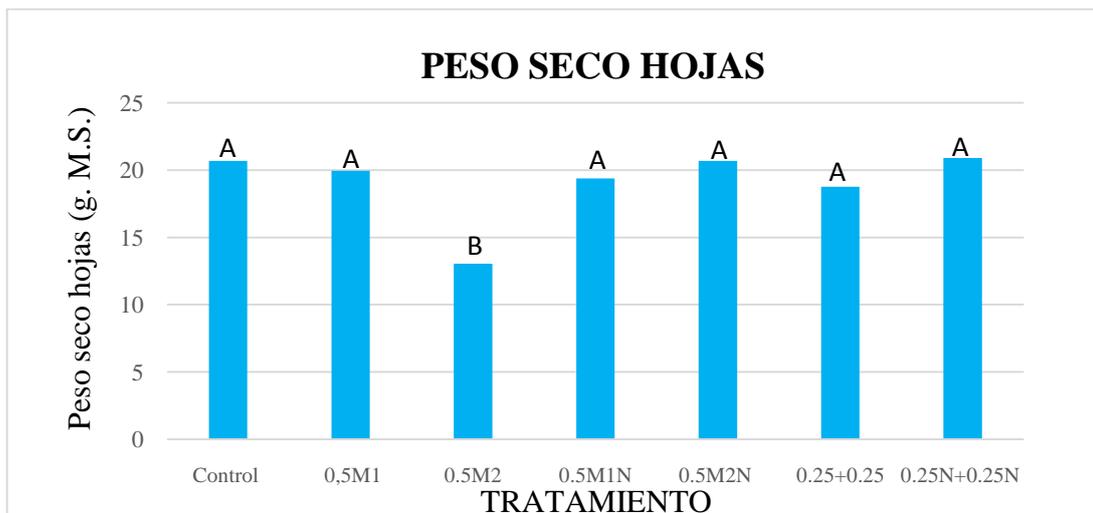


FIGURA 5.1. Efecto del tratamiento de Zn sobre el peso seco de las hojas de brócoli.

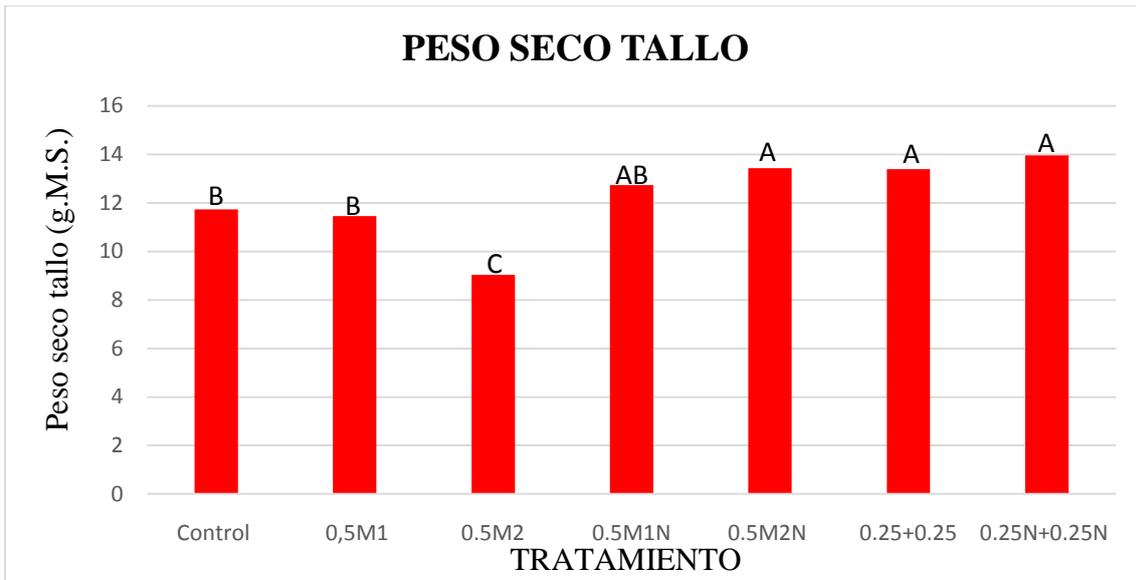


FIGURA 5.2. Efecto del tratamiento de Zn sobre el peso seco del tallo de brócoli.

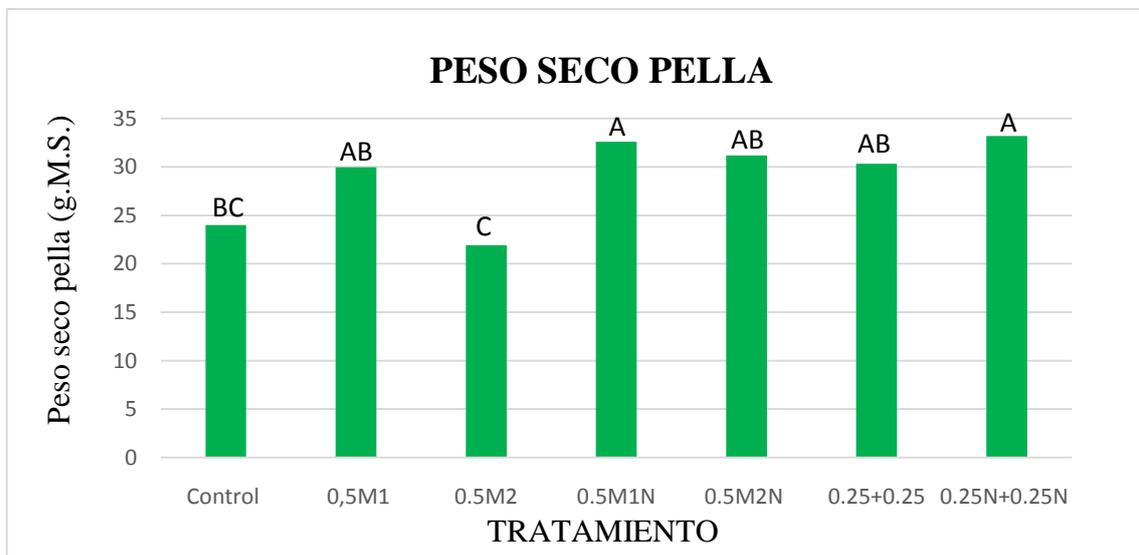


FIGURA 5.3. Efecto del tratamiento de Zn sobre el peso seco de la pella de brócoli.

En las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se representan la influencia de los distintos tratamientos estudiados sobre el peso seco de las hojas, del tallo y de la pella. Destaca en los tres casos el tratamiento 0,5M₂ como el que estadísticamente produjo los menores

pesos secos, sin encontrarse diferencias significativas entre los demás tratamientos estudiados. Esto se puede atribuir a un ligero efecto tóxico en la aplicación, bastante avanzada en el crecimiento de la pella, de este tratamiento. Hecho que no ocurrió al aplicarlo en combinación con el N. Mientras que el peso seco medio de las hojas producidas fue de 19,06 g, la del tallo 12,25 g y la de la pella, el más interesante desde el punto de vista del agricultor, fue de 29,03 g.

Los resultados obtenidos en numerosos estudios indican la importancia del Zn, nutriente esencial para obtener un rendimiento adecuado en numerosos cultivos, especialmente cuando se desarrollan en suelos con contenidos en Zn de bajos a medios. Barlog et al. (2016) descubrieron que aumentando gradualmente la dosis de Zn (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 kg ha⁻¹) el rendimiento de las raíces de remolacha azucarera fue significativamente mayor en el intervalo de 7,6 a 21,8%, respectivamente. Otros estudios experimentales mostraron también un efecto positivo de las aplicaciones de Zn en el rendimiento de semillas de mostaza (Sahito et al., 2014) o grano de maíz (Potarzycki y Grzebisz, 2009). Coolong y Randle (2004) observaron un aumento lineal de la concentración de Zn debido a la fertilización con Zn en un sistema hidropónico sobre nabo (*Brassica rapa*); sin embargo, usaron cantidades más altas de Zn en una solución de crecimiento, hasta los niveles que se desarrollan síntomas de toxicidad en los brotes de brócoli. Abd El-All (2014) encontró que la pulverización foliar de Zn resultó en un aumento del rendimiento de brócoli de un 5,9 a 6,2% cuando se aplicó 100 mg Zn por kg⁻¹ de suelo a un aumento entre 24,3 a 28,3% cuando la aplicación fue de 200 mg Zn kg⁻¹ de suelo. Slosar et al. (2017), por su parte, también obtuvieron un rendimiento significativamente mayor debido a la aplicación foliar de 1,50 L Zn ha⁻¹, obteniendo una tasa menor cuando se aplicó 0,75 L Zn ha⁻¹. Estudiaron también el contenido de polifenoles totales (TPC) y la actividad antioxidante (AOA) en el brócoli que se vieron afectados negativamente por la aplicación foliar.

Según White et al. (2018) en sus estudios realizados de biofortificación con Zn en Brassicas, la fitodisponibilidad del Zn en el suelo se ve afectado por muchos factores, como puede ser el pH, el contenido de materia orgánica, mineral, composición de la arcilla, la porosidad y el contenido de humedad. Según sus resultados, cree que es poco prudente extrapolar a partir de las concentraciones de Zn en los fertilizantes, ya que en los suelos la fitodisponibilidad de Zn aplicado como fertilizante, disminuye rápidamente, por ello,

generalmente se consigue la biofortificación de Zn en los cultivos mediante la aplicación foliar.

5.2. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Ca, Fe, Mg y Zn en las diferentes partes de la planta

La razón de incluir en las analíticas los tallos y las hojas por separado se fundamenta en un reciente estudio de Liu et al. (2018) quienes analizaron el potencial nutricional de las hojas y tallos de brócoli, debido a que la pella constituye solamente alrededor del 15% de la biomasa total de la planta. Si también se consumieran el tallo y las hojas, la productividad del cultivo de brócoli aumentaría hasta un 83%. En este ensayo, todas las concentraciones de Ca, Fe y Zn se han visto influenciadas significativamente en todas las partes analizadas, tanto por el tratamiento de Zn empleado como en la interacción Parte*Zn, excepto para la concentración de Mg, que sólo fue significativamente influido por la parte del brócoli analizada (Tabla 5.3).

TABLA 5.3. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) de las concentraciones de Ca, Fe, Mg y Zn según la parte analizada y el tratamiento de Zn empleado.

Fuente	GL	Ca	Fe	Mg	Zn
Parte	2	436,65***	0,00***	0,00***	0,00***
Zinc	6	3,49**	0,04*	0,84	0,00***
Parte*Zinc	12	2,18**	0,03*	0,24	0,00***

*Significación a un 0,05 nivel de probabilidad

** Significación a un 0,01 nivel de probabilidad

***Significación a un 0,001 nivel de probabilidad

5.2.1. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Ca en las diferentes partes de la planta

El Ca es un elemento esencial para las personas, plantas y animales. De acuerdo con los resultados mostrados por FAO/WHO (2000) la mínima cantidad requerida de

ingesta de Ca, tanto para hombres como para mujeres de entre 25 a 50 años, es de 800 mg al día, estando una ingesta deficiente asociada con problemas neuromusculares y neuropsiquiátricos.

TABLA 5.4. Efecto del tratamiento de Zn sobre la concentración de Ca en cada una de las fracciones del brócoli.

Tratamiento	Ca (mg kg ⁻¹)		
	Pella	Tallo	Hojas
Control	3868 DEF	4774 DE	8679 C
0,5M ₁	3958 DEF	4307 DE	8540 C
0,5M ₂	4743 DE	4914 D	10952 A
0,5M ₁ N	4078 DE	4174 DE	10352 AB
0,5M ₂ N	3591 EF	3965 DE	10577 AB
0,25+0,25	3659 EF	3912 DEF	10181 AB
0,25N+0,25N	2775 F	4381 DE	9428 BC
Media	3810,4 C	4346,9 B	9815,5 A

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS en cada una de las partes estudiadas.

En la Tabla 5.4 y en la Figura 5.4. se representan la concentración de Ca en cada una de las partes del brócoli según el tratamiento empleado. Los brócolis no fertilizados tuvieron una concentración media de Ca de 3868 mg Ca kg⁻¹ en la pella, 4774 mg Ca kg⁻¹ en el tallo y de 8679 mg Ca kg⁻¹ en las hojas. Los resultados obtenidos por Rivera Martín (pendiente de publicación) son diferentes, ya que la mayor concentración la obtuvieron los floretes, con un valor de 2400 mg Ca kg⁻¹ y en tallos+hojas, disminuyó en un 50%. Por otro lado, valores similares a los obtenidos en este ensayo fueron los de las 11 variedades cultivadas por Rosa et al. (2002) que tenían un contenido que varió entre 3800 y 7000 mg Ca kg⁻¹ y menores aún fueron los resultados obtenidos por Kaluzevic et al. (2016), variando el contenido de Ca entre 2100 mg kg⁻¹ a 4400 mg kg⁻¹ M.S. en la pella.

Estudiando todas las dosis en conjunto, la acumulación fue significativamente mayor en las hojas, con $9815,5 \text{ mg Ca kg}^{-1}$, seguida del tallo con $4346,9 \text{ mg Ca kg}^{-1}$ y de las pellas con $3810,4 \text{ mg Ca kg}^{-1}$, lo que pone de manifiesto el interés, desde el punto de vista nutricional, de introducir las hojas de brócoli en la dieta, no sólo animal sino también en la humana.

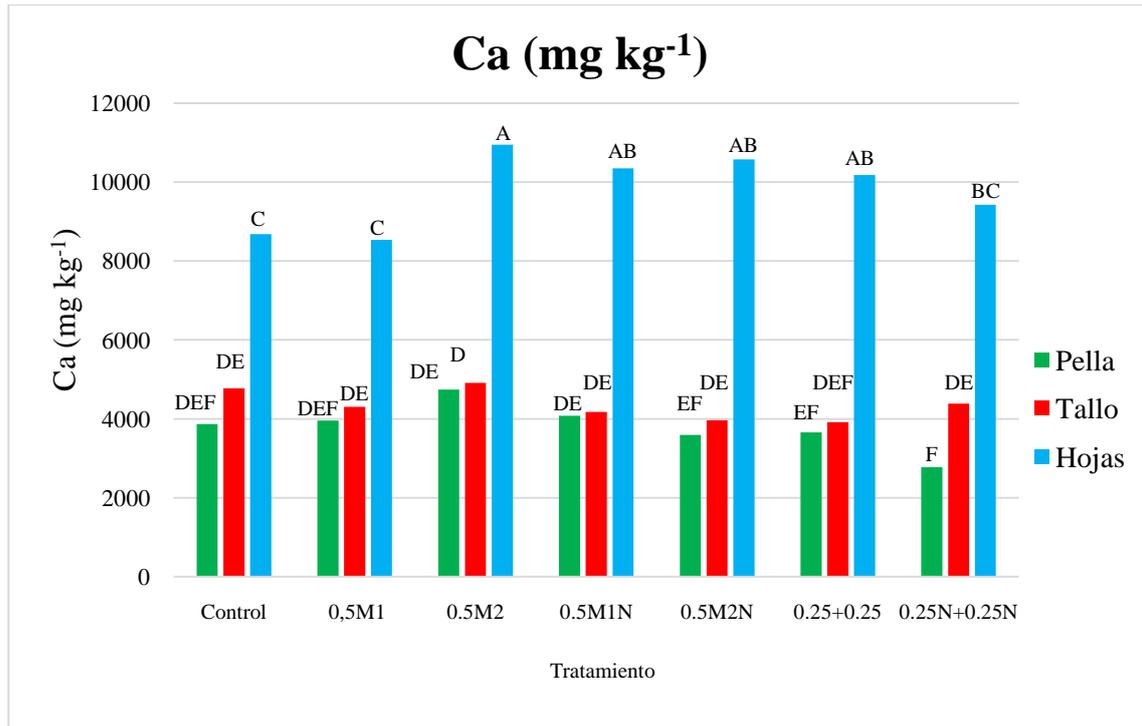


FIGURA 5.4. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

Estudiando la interacción, por un lado vemos que sólo se encontraron diferencias significativas en cuanto a las pellas entre los tratamientos $0,5M_2$ y $0,5M_1N$ (con más de $4000 \text{ mg Ca kg}^{-1}$) con el tratamiento $0,25N+0,25N$, con $2775 \text{ mg Ca kg}^{-1}$. En los tallos, las mayores cantidades de Ca se acumularon con la aplicación de $0,5\%$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a las dos semanas de la aparición de la pella, con $6869,5 \text{ mg Ca kg}^{-1}$, sin diferencias significativas cuando la aplicación fue combinada con N a la aparición de la pella, con un $9,7\%$ menos, ni con los demás tratamientos. En las hojas si hay diferencias significativas entre el tratamiento $0,5M_2$ con $10952 \text{ mg Ca kg}^{-1}$ y los tratamientos control y $0,5M_1$ con 8679 y $8540 \text{ mg Ca kg}^{-1}$, respectivamente.

En nuestros resultados si ha habido diferencias significativas como se ha podido comprobar, sin embargo, en el estudio de Gómez-Coronado et al. (2018), y teniendo en cuenta también que el cultivo es diferente, ya que ellos estudiaban trigo harinero, tras la aplicación foliar de Zn no apreciaron diferencias significativas. Lo que si cabe destacar es que la aplicación de Zn en ningún caso provocó la disminución en la acumulación de Ca. Por tanto, desde el punto de vista del agricultor, el tratamiento que más le interesaría en este caso sería el 0,5M₂, ya que es el que más cantidad de Ca almacena en la pella, aunque también en las hojas y en el tallo. La ingesta de 100 gramos de brócoli biofortificado con el tratamiento 0,5M₂ supondría una ingesta de 474 g si lo que se ingiriese fueran las pellas, de 491 g si fuera de tallos y de 1095 g si fuera de hojas, lo que supone más de un 45% de los requerimientos de Ca para un adulto (800 mg al día) en los dos primeros casos y de un 137% en el caso de ingerir 100 g de hojas, mostrando el interés que esta fracción puede tener en la alimentación.

5.2.2. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Fe en las diferentes partes de la planta

El Fe es un elemento esencial para la vida, siendo considerado como uno de las principales causas de anemia en el mundo (Grandy et al., 2010). De acuerdo con los resultados mostrados por FAO/WHO (2000) la cantidad requerida de ingesta de Fe para hombres es de 10 mg y de 15 mg para mujeres, con edades comprendidas entre los 25 y 50 años.

En la Tabla 5.5. y en la Figura 5.5. se representan la concentración de Fe en cada una de las partes del brócoli según el tratamiento empleado. Los brócolis no fertilizados tuvieron una concentración de Fe de 56,30 mg Fe kg⁻¹ en la pella, 39,20 mg Fe kg⁻¹ en las hojas y de 36,25 mg Fe kg⁻¹ en el tallo. Resultados muy similares se encontraron en el estudio realizado por Kaluzevic et al. (2016) en diferentes variedades de brócoli, donde obtuvieron contenidos que variaron entre 25,85 mg kg⁻¹ a 54,14 mg kg⁻¹ M.S. Por su parte, en la investigación realizada por Acikoz (2011), también se puso de manifiesto que las mayores cantidades de Fe fueron encontradas en las pellas alcanzando los 100 mg Fe kg⁻¹.

Liu et al. (2018) también confirman que el florete es la parte del brócoli que más cantidad de Fe acumula sin la necesidad de aplicar ningún tratamiento. En estudios de Rivera Martín et al. (pendiente de publicación) también se constató la importancia del procesado en el contenido de Fe en las pells del brócoli, encontrando que el hervido de 5 minutos de las pellas disminuyó en un 33% el contenido de Fe total.

TABLA 5.5. Efecto del tratamiento de Fe sobre la concentración de Fe en cada una de las fracciones del brócoli.

Tratamiento	Fe (mg kg ⁻¹)		
	Pella	Tallo	Hojas
Control	56,30 AB	36,25 EFGH	39,20 EFG
0,5M ₁	63,33A	32,33 FGHI	30,30 GHI
0,5M ₂	50,15 BCD	30,45 GHI	36,87 EFGH
0.5M ₁ N	59,48 AB	46,08 CDE	41,68 DEF
0.5M ₂ N	57,58 AB	26,13 I	40,18 DEFG
0.25+0.25	64,18 A	32,10 FGHI	34,08 FGHI
0.25N+0.25N	56,07 ABC	28,38 HI	40,53 DEF
Media	58,15 A	33,10 C	37,55 B

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

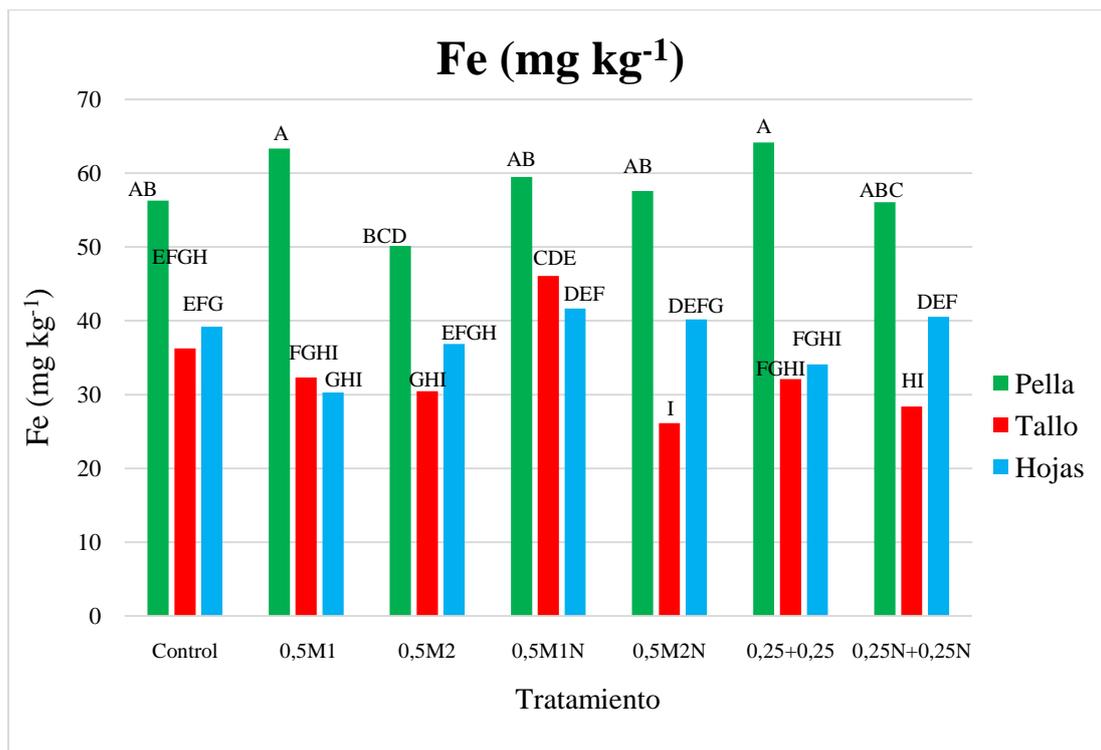


FIGURA 5.5. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

Estudiando todos los tratamientos de Zn aplicados, la acumulación fue significativamente mayor en las pellas, con $58,15 \text{ mg Fe kg}^{-1}$, seguida de las hojas con $37,55$ y del tallo con $33,10 \text{ mg Fe kg}^{-1}$. Lo mismo ha ocurrido en el estudio de Rivera Martín (pendiente de publicación), al aplicar el Zn foliar, siendo la concentración mayor en las pellas, con unos 40 mg Fe kg^{-1} , y menor en la encontrada en los tallos más las hojas, con unos 25 mg Fe kg^{-1} .

Estudiando la interacción, vemos que se encontraron diferencias significativas en las tres partes estudiadas. En las pellas hay diferencias significativas entre los tratamientos $0,5M_1$ y $0,25+0,25$ con más de 60 mg Fe kg^{-1} y el tratamiento $0,5M_2$, con $50,15 \text{ mg Fe kg}^{-1}$. En los tallos se ha acumulado más cantidad de Fe en el tratamiento $0,5M_1N$ existiendo diferencias significativas con el tratamiento $0,5M_1$, $0,5M_2$, $0,5M_2N$, $0,25+0,25$ y con $0,25N+0,25N$, llegando las diferencias hasta un $43,29\%$ menos. Y por último en las hojas se han acumulado más de 40 mg Fe kg^{-1} con la aplicación de $0,5\%$ de ZnSO_4 combinada con N cuando apareció la pella y la aplicación de $0,25\%$ de ZnSO_4 combinada con N cuando apareció la pella y dos semanas después existiendo diferencias significativas de

más de 10 mg Fe kg^{-1} con la aplicación de 0,5% de ZnSO_4 a la aparición de la pella. En el cultivo del trigo, Gomez-Coronado et al. (2018) comprobó que la aplicación foliar de Zn produjo una cantidad de Fe más o menos similar a los resultados obtenidos en este estudio y en China, Wang et al. (2012) no encontraron incrementos ni disminuciones significativas en la cantidad de Fe en grano en comparación con la No aplicación de Zn.

Teniendo en cuenta todas las fracciones en conjunto y por separado, el tratamiento más constante fue el de 0,5M1N. Una ingesta de 100 g de cada una de las fracciones supondría 5,9 g de Fe en las pellas, 4,6 g en tallos y 4,2 g en hojas lo que cubre prácticamente la mitad de las necesidades de los hombres y un tercio de los requerimientos de las mujeres recomendados por FAO/WHO (2000).

5.2.3. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Mg en las diferentes partes de la planta

El Mg es un elemento esencial para las personas, plantas y animales, presentando diversas funciones biológicas (Cakmak, 2010). De acuerdo con los resultados mostrados por FAO/WHO (2000) la cantidad diaria recomendada de ingesta de Mg para hombres es de 350 mg y para mujeres de 280 mg, todos ellos con edades comprendidas entre 25 y los 50 años. En la Tabla 5.6 y en la Figura 5.6. se representan la concentración de Mg en cada una de las partes del brócoli según el tratamiento empleado. Los brócolis no fertilizados tuvieron una concentración de $2141,5 \text{ mg Mg kg}^{-1}$ en las pellas, $1936,5 \text{ mg Mg kg}^{-1}$ en el tallo y de $823,0 \text{ mg Mg kg}^{-1}$ en las hojas. Rivera Martín et al. (pendiente de publicación) encontraron que las concentraciones totales de Mg fueron significativamente mayores en el tallo+hojas de la planta que en el florete, en este caso la diferencia de concentraciones en los brócolis no fertilizados de ambos estudios puede ser debido a las condiciones climatológicas en la que se ha llevado a cabo cada uno de los estudios, ya que en nuestro caso se ha acumulado más en las pellas y en el estudio de Rivera Martín se ha acumulado más en la planta. Otros ensayos como los de Kaluzevic et al. (2016) y Rosa et al. (2002) confirman estos resultados, ya que obtuvieron concentraciones en sus respectivos cultivos de brócoli, que variaron entre 1800 mg y $3100 \text{ mg Mg kg}^{-1} \text{ M.S.}$ y por otro lado variaron entre 1300 y $2000 \text{ mg Mg kg}^{-1}$, respectivamente.

TABLA 5.6. Efecto del tratamiento de Zn sobre la concentración de Mg en cada una de las fracciones del brócoli.

Tratamiento	Mg (mg kg ⁻¹)		
	Pella	Tallo	Hojas
Control	2141,5 A	1936,5 A	823,0 A
0,5M ₁	2104,5A	1954,5 A	831,6 A
0,5M ₂	1896,4A	2032,7 A	829,1 A
0,5M ₁ N	2145,6A	1837,6 A	924,5 A
0,5M ₂ N	2118,5A	1709,7 A	1038,7 A
0,25+0,25	1897,7A	1713,4 A	975,7 A
0,25N+0,25N	2006,1A	1840,2 A	844,4 A
Media	2044,3 A	1860,7 B	895,3 C

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

Estudiando todas las dosis en conjunto, la acumulación fue significativamente mayor en las pellas, con 2044,3 mg Mg kg⁻¹, seguida del tallo con 1860,7 y de las hojas con 865,3 mg Mg kg⁻¹.

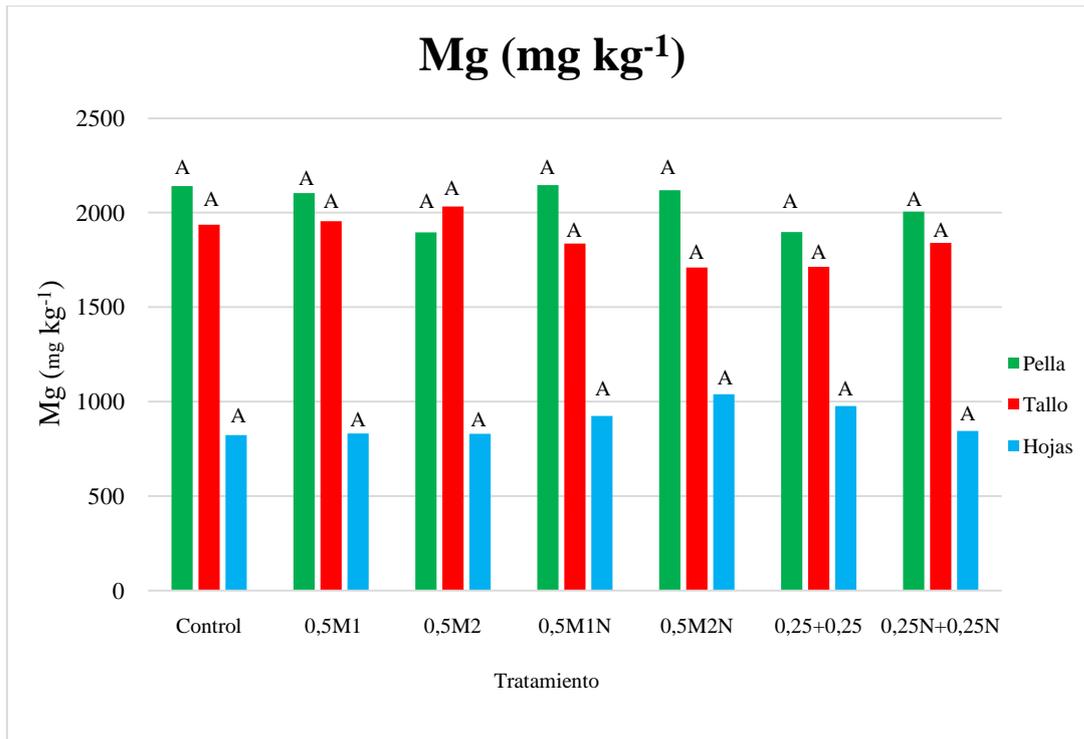


FIGURA 5.6. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

En cuanto a la interacción, vemos que no se encontraron diferencias significativas de este nutriente en ninguna de las partes estudiadas, en contra de lo encontrado en un reciente estudio de Gómez-Coronado et al. (2018) quienes obtuvieron resultados muy similares en la no aplicación de Zn y en la aplicación foliar.

El Mg no se va a ver influido a la hora de elegir un tratamiento u otro ya que se ha comprobado que no se han obtenido diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Una ingesta de 100 g de cada una de las fracciones supondrían de media 204,4 g de Mg en las pellas, 186,1 g en tallos y 89,5 g en hojas lo que cubre más de la mitad de las necesidades de los hombres y de las mujeres si ingieren las pellas y los tallos, sin embargo, solo se cubriría el 32 y 24% de las necesidades de hombres y mujeres, respectivamente, si se ingieren las hojas.

5.2.4. Efecto de los tratamientos sobre el contenido en Zn en las diferentes partes de la planta

Como ya se ha explicado ampliamente en la introducción, el Zn es uno de los minerales esenciales que puede presentarse de manera deficiente en la alimentación humana, principal vía de incorporación en el organismo. Su deficiencia es el quinto factor clave de enfermedad y acarrea depresión del sistema inmune, cardiopatías, asma, epilepsia, retraso del crecimiento, infertilidad, aumento en la incidencia de sufrir ciertos tipos de cáncer, etc., y la muerte en los casos más grave (Alloway, 2008; Levenson y Morris, 2011). Se ha estimado que alrededor de un 30% de la población es deficiente en este mineral, y se debe fundamentalmente a la ingesta de productos cultivados en áreas con baja fitodisponibilidad de Zn. La ingesta diaria recomendada (RDI) en Europa es de 15 mg día Zn⁻¹.

TABLA 5.7. Efecto del tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn en cada una de las fracciones del brócoli.

Tratamiento	Zn (mg kg ⁻¹)		
	Pella	Tallo	Hojas
Control	41,60 G	12,25 H	10,82 H
0,5M1	68,07 F	18,58 GH	110,90 BC
0,5M2	203,30 A	18,75 GH	120,06 BC
0,5M1N	82,98 DEF	17,60 GH	96,22 CDE
0,5M2N	122,73 B	16,18 GH	115,33 BC
0,25+0,25	106,25 BCD	16,20 GH	102,35 BCDE
0,25N+0,25N	120,12 BC	14,28 H	78,50 EF
Media	106,43 A	16,26 C	90,60 B

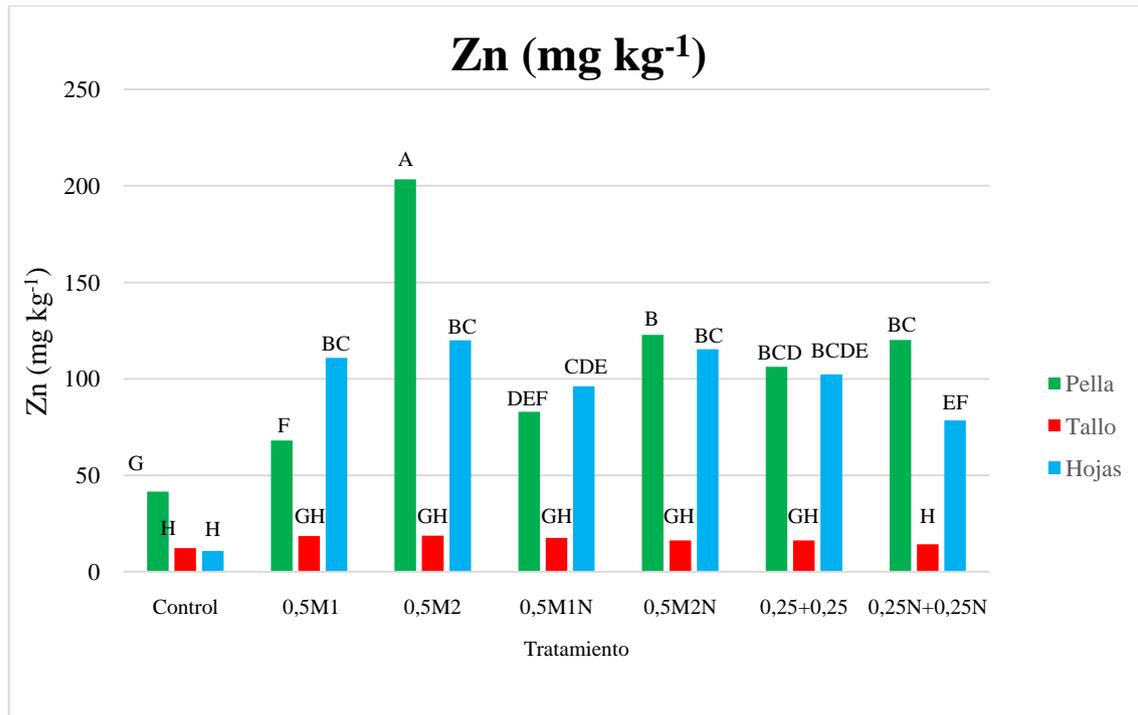


FIGURA 5.7. Efecto de la interacción Parte de la planta*Tratamiento de Zn sobre la concentración de Zn. Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

En la Tabla 5.7. y en la Figura 5.7. se representan la concentración de Zn en cada una de las partes del brócoli según el tratamiento empleado. Los brócolis no fertilizados tuvieron una concentración de $41,60 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ en la pella, $12,25 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ en el tallo y de $10,82 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ en las hojas. Liu et al. (2018) en su reciente estudio también afirmaron que el florete es la parte que más cantidad de Zn acumula, pero por el contrario, en el estudio de Rivera Martín (pendiente de publicación) ha encontrado mayores concentraciones en la planta y en menor media en el florete, siendo las cantidades de $47,6 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ y $39,3 \text{ mg Zn kg}^{-1}$, respectivamente. En los estudios realizados por Kaluzevic et al. (2016) el contenido fue similar, variando entre $42,32$ y $65,86 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ M.S. Lo mismo ha ocurrido con Bosiacki y Golcz (2004), que encontraron valores similares $45,78 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ peso seco en las cabezas de brócoli. Sin embargo, Acikoz (2011) observó un menor contenido de Zn $32,21$ a $35,87 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ M.S.

Estudiando todas las dosis en conjunto, la acumulación fue significativamente mayor en las pellas, con 106,43 mg Zn kg⁻¹, seguida de las hojas con 90,60 y de los tallos con 12,25 mg Mg kg⁻¹

Estudiando la interacción, por un lado vemos que el tratamiento 0,5M₂ con más de 200 mg Zn kg⁻¹, fue significativamente mayor al resto de tratamientos, llegando a diferencias de más de 160 mg kg⁻¹ con el tratamiento control que es el que menos cantidad de Zn acumuló en las pellas. Esto, unido al menor desarrollo de las plantas en este tratamiento pone en evidencia el efecto tóxico del mismo. La ingesta de 100 g de pellas biofortificadas con este tratamiento supondrían más de 20 mg Zn, lo que supera las necesidades diarias recomendadas. En los tallos no hay diferencias significativas entre los siete tratamientos aunque donde menos cantidad de Zn se ha acumulado ha sido con los tratamientos control y 0,25N+0,25N. En las hojas, las mayores cantidades de Ca se han acumulado, con el tratamiento 0,5M₁, 0,5M₂ y 0,5M₂N encontrando las mayores diferencias significativas con el tratamiento control que ha acumulado menos del 10% que dichos tratamientos.

La biofortificación del Zn no está relacionada con una disminución de la composición mineral del brócoli, por tanto, este puede ser un punto clave, porque cada vez el brócoli se consume más gracias a su buena composición mineral. En cualquier caso, la composición nutricional muestra que todo el brócoli cosechado podría constituir una buena fuente nutricional, no sólo el florete sino también el tallo y las hojas, para consumo animal y humano. Esta es una línea interesante que hay que desarrollar.

Al tener un tratamiento que acumula demasiado Zn, el tratamiento a elegir, teniendo en cuenta una visión global del estudio aunque sin perder el punto de vista de la biofortificación, sería el tratamiento 0,25+0,25 aunque el 0,5M₂N también es muy interesante. ya que es el que acumula muy eficientemente el Zn en la pella, aunque también en las hojas y en el tallo. La ingesta de 100 g de brócoli biofortificado con el tratamiento 0,25+0,25 supondría una ingesta de 10,6 g si lo que se ingieren son las pellas, 10,2 g si es de hojas y 1,6 g si es de tallo, por lo que se cubren dos tercios de las necesidades de hombres y mujeres en el caso de pellas y hojas, significando solamente un 10% en el caso de ingerir tallos.

CAPÍTULO 6
CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos en este ensayo de invernadero, se pueden indicar las siguientes conclusiones:

- El suelo donde se ha llevado a cabo el ensayo ha sido susceptibles de ser biofortificados con este nutriente.

- Ninguna de las aplicaciones provocó efectos significativos ni en la altura de la planta ni en el de la pella ni en el tamaño de la pella, medido por sus diámetros mayor y menor así como su configuración ni el diámetro del tallo. Sin embargo, sí que se observó cierta toxicidad del tratamiento $0,5M_2$ ya que provocó menores pesos de todas las fracciones estudiadas, hojas, tallo y pella. En cuanto al resto de tratamientos, se obtuvieron pesos significativamente mayores en los tratamientos $0,5M_1$ y $0,25N+0,25N$ en las pellas y $0,5M_2N$, $0,25+0,25$ y $0,25N+0,25N$ en los tallos sin embargo el tratamiento $0,5M_2$ fue el único que obtuvo pesos significativamente menores en las hojas.

- Todas las concentraciones de Ca, Fe y Zn se vieron significativamente influidas por la parte del brócoli analizado, acumulándose mayoritariamente en la pella en los casos del Fe, Mg y Zn mientras que el Ca se concentró principalmente en las hojas.

- La concentración de Ca, de media 9800 mg kg^{-1} en las hojas, 2,3 veces menos en tallo y 2,6 veces menos en las pellas, se vio significativa y positivamente afectada por las aplicaciones con Zn, siendo, desde el punto de vista del agricultor, $0,5M_2$, el tratamiento que más le interesaría, ya que es el que más cantidad de Ca almacena en la pella, aunque también en las hojas y en el tallo.

- En la concentración de Fe en la que la pella tiene más de un 50% que en tallo y hojas, destacan los tratamientos $0,5M_1$ y $0,25+0,25$ en el caso de las pellas, el tratamiento $0,5M_1N$ en el caso el tallo y de las hojas.

- La acumulación de Mg sólo dependió significativamente de la parte de la planta estudiada siendo la concentración menor en un 10 y 56,2% en tallos y hojas, respectivamente que en la pella.

- La concentración media de Zn en la pella, con 106 mg kg^{-1} , fue significativamente mayor que la de las hojas, con 91 mg kg^{-1} y el tallo, con 16 mg kg^{-1} . El tratamiento $0,5M_2$ acumuló, con diferencia, mucho más Zn en la pella que los

demás tratamientos, cantidad que podría acarrear problemas, ha sido con el que se ha obtenido una mayor cantidad de Zn, siendo el tratamiento control el que menos cantidad de este mineral acumuló en las pellas. Por tanto, esto, unido al menor desarrollo de las plantas en este tratamiento pone en evidencia el efecto tóxico del mismo. Al tener un tratamiento que acumula demasiado Zn, el tratamiento a elegir.

Teniendo en cuenta una visión global del estudio y sin perder el punto de vista de la biofortificación, objetivo básico del experimento, el tratamiento 0,25+0,25, aunque también el de 0,5M₂N serían los más interesantes. La ingesta de 100 g de brócolis biofortificados con 0,25+0,25 supondrían 10,6 g Zn si lo que se ingieren son las pellas, 10,2 g si es de hojas y 1,6 g si es de tallo, por lo que se cubren dos tercios de las necesidades de hombres y mujeres en el caso de pellas y hojas, significando solamente un 10% en el caso de ingerir tallos. Respecto a los demás nutrientes serían 366 mg Ca, 6,4 mg de Fe y 190 mg de Mg, si lo que se ingieren son las pellas, 391 mg Ca, 3,2 mg de Fe y 171 mg de Mg, en el caso de los tallos y 1020 mg Ca, 3,4 mg de Fe y 98 mg de Mg en el caso de las hojas, lo que demuestra que los brócolis son un excelente alimento del que no hay que olvidar ni los tallos ni las hojas.

CAPÍTULO 7
BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-All HM (2014). Improving growth, yield, quality and sulphur content as anticancer of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) plants by some fertilization treatments. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 3: 13–19.
- Acikoz EF (2011). Influence of different sowing times on mineral composition and vitamin C of some broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivars. *Scientific Res. Essays*, 6(4): 760-765.
- Alloway BJ (2004) Zinc in soils and crop nutrition. IZA Publications. International Zinc Association, Brussels, pp 1–116
- Alloway BJ (2008). Zn in the soils and crop nutrition. International Zn Association.
- Alloway BJ (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ. Geochem. Health* 31: 537-548.
- Azeke MA, Egielewa SJ, Eigbogbo MU, Ihimire IG (2011). Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *J. Food Sci. Tech.* 48, 724–729
- Azeke MA, Egielewa SJ, Eigbogbo MU, Ihimire IG. (2011). Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *J. Food Sci. Tech.* 48, 724–729.
- Barlóg P, Nowacka A, Błaszyk R (2016). Effect of zinc band application on sugar beet yield, quality and nutrient uptake. *Plant, Soil and Environment*, 62: 30–35.
- Bohn L, Meyer AS, Rasmussen SK (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J. Zhejiang Univ Sci. B.* 9: 165-191. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00415-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00415-1).
- Borowski J, Szajdek A, Borowska EJ, Ciska E, Zieliński H (2008). Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Eur Food Res Technol* 226: 459-465.

- Bosiacki M, Golcz A, (2004). Zinc and copper content in vegetables grown near communication routes in Środa Wielkopolska commune. *Rocz. AR Pozn., Ogrodn.*, 37: 13-17.
- Bouis HE (2003). Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost? *Proceed. Nutr. Soc.* 62, 403e411.
- Bouis HE, Hotz C, McClafferty B, Meenakshi JV, Pfeiffer WH (2011) Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr Bull* 32:S31–S40. doi:10.1079/9781780642994.0202
- Cakmak Emre, and Pinar Irlayici Cakmak, An Analysis of Causes of Disputes in the Construction Industry Using Analytical Network Process, *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 109, 2014, 183-187.
- Cakmak I, Kalayci M, Kaya Y, Torun AA, Aydin N, Wang Y, Arisoy Z, Erdem H, Yazici A, Gokmen O, Ozturk L, Horst WJ (2010b) Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *J Agr Food Chem* 58:9092–9102.
- Cakmak I, Kalayci M, Kaya Y, Torun AA, Aydin N, Wang Y, Arisoy, Z.; Erdem, H.; Yazici, A; Gokmen O; Ozturk L; Horst WJ (2010). Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *J. of Agric. and Food Chem.* 58:9092–9102.
- Cakmak I, Yilmaz A, Ekiz H, Torun B, Erenoglu B, Braun HJ (1996) Zinc deficiency as a critical nutritional problem in wheat production in Central Anatolia. *Plant Soil* 180:165–172.
- Cakmak I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil* 2008; 302:1–17.
- Coolong TW, Randle WM. (2004): Zinc availability in hydroponic culture influences glucosinolate concentrations in *Brassica rapa*. *HortScience*, 39: 84–86.
- Denre M, Bandopadhyay PK, Chakravarty A, Pal S, Bhattacharya A (2014b): Influence of foliar applications of chelator and micronutrients on antioxidants in green chilli. *International Journal of Nutrition and Metabolism*, 6: 18–27.

- Denre M, Bandopadhyay PK, Chakravarty A, Pal S, Bhattacharya A. (2014a): Effect of foliar application of humic acid, zinc and boron on biochemical changes related to productivity of pungent pepper (*Capsicum annuum* L.). African Journal of Plant Science, 8: 320–335.
- Elmadfa I (2009). The European Nutrition and Health Report. Forum of Nutrition, Vienna, 62: 412 pp.
- Erenoglu EB, Kutman UB, Ceylan Y, Yildiz B, Cakmak I (2011). Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root to shoot translocation and remobilization of zinc (65Zn) in wheat. New Phytol. 189:438– 448.
- Eyupoglu F, Kurucu N, Sanisa U (1994) Status of plant available micronutrients in Turkish soils (in Turkish). Annual Report, Report No: R-118. Soil and Fertilizer Research Institute, Ankara, 1994; 25–32.
- Farnham MW, GruSak MA, Wang M (2000). Calcium and magnesium concentration of inbred and hybrid broccoli heads. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 125: 344-349.
- Farnham MW, Stephenson KK, Fahey JW (2000). Capacity of broccoli to induce a mammalian chemoprotective enzyme varies among inbred lines. J. Am. Soc. Horticult. Sci. 125(4): 482-488
- Francisco M, Tortosa M, Martinez-Ballesta MC, Velasco P, Garcia-Viguera C. (2017). Nutritional and phytochemical value of Brassica crops from the agri-food perspective. Annals of Applied Biology 170: 270-285.
- Ghasemi S, Khoshgoftarmanesh AH, Afyuni M, Hadadzadeh H. (2013). The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulphate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. European Journal of Agronomy, 45, 68–74.
- Gómez-Coronado F, Poblaciones MJ, Almeida A, Cakmak I (2016). Zinc (Zn) concentration of bread wheat grown under Mediterranean conditions as affected by genotype and soil/foliar Zn application. Plant Soil 401: 331-346.

- Graham RD, Welch RM, Saunders, DA, Ortiz-Monasterio I, Bouis HE, Bonierbale M, et al. (2007). Nutritious subsistence food systems. *Adv. Agron.* 92: 1-74.
- Grandy G, Medina M, Soria R, et al. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infect Dis* 2010;10:253.
- Guo JX, Liao WQ, Ling N, Hu X, Sui B, Shang Q, Guo S (2013). Effects of combination use of N and Zn fertilizers on the yield and N, Zn concentrations in wheat. *J. Nanjing Agric. University* 36:77–82.
- Gupta RK, Gangoliya SS, Singh NK (2015). Reduction of phytic acid enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 676-684. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0978-y>
- Harris D, Rashid D, Miraj G, Arif M, Shah H. ‘On-farm’ seed priming with zinc sulphate solution – a cost-effective way to increase the maize yields of resource-poor farmers. *Field Crops Res* 2007; 102:119–27.
- Harris D, Rashid D, Miraj G, Arif M, Shah H. cebado semilla 'On-Farm' con solución de sulfato de zinc - una forma rentable para aumentar los rendimientos de maíz de los agricultores pobres en recursos. *Cultivos de Campo Res* 2007; 102: 119-27.
- Hotz C, Brown KH. 2004. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin* 25:S91–S204.
- House WA (1999). Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field Crop Res.* 60: 115-141.
- Huett DO, Maier NA, Sparrow LA, Piggot TJ. (1997). Vegetable crops. In D. J. Reuter & J. B. Robinson (Eds.), *Plant analysis: An interpretation manual* (2nd ed., pp. 383–464). Collingwood, Victoria, Australia: CSIRO.
- Huett DO, Maier NA, Sparrow LA, Piggot TJ. (1997). Vegetable crops. In D. J. Reuter & J. B. Robinson (Eds.), *Plant analysis: An interpretation manual* (2nd ed., pp. 383–464). Collingwood, Victoria, Australia: CSIRO.

- Hussain S, Maqsoodab MA, Rengel Z., & Aziz, T. (2012). Biofortification and estimated human bioavailability of zinc in wheat grains as influenced by methods of zinc application. *Plant and Soil*, 361, 279–290.
- Ibrahim EA, Ramadan WA. (2015). Effect of zinc foliar spray alone and combined with humic acid or/and chitosan on growth, nutrient elements content and yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants sown at different dates. *Scientia Horticulturae*, 184, 101–105.
- Jaramillo NJE, Díaz DCA (2006). *El Cultivo de las Crucíferas*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, (CORPOICA), Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. Manual Técnico 4. 176 pp.
- Jones RB, Faragher JD, Winkler S (2006). A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Posthar Biol Technol* 41: 1-8.
- Joy, EJM, Stein, AJ, Young SD, Ander EL, Watts MJ, Broadley MR. 2015. Zinc-enriched fertilizers as a potential public health intervention in Africa. *Plant and Soil* 389:1–24.
- Kałuzewicz A, Bosiacki M, Fraszczak B. Mineral composition and the content of phenolic compounds of ten broccoli cultivars. *J. Elementol.* 2016, 21, 53–65.
- Kutman UB, Yildiz B, Cakmak I (2011). Effect of nitrogen on uptake, remobilization and partitioning of zinc and iron through the development of durum wheat. *Plant Soil* 342:149–164.
- Levenson CW, Morris D (2011). Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood. *Adv Nutr* 2: 96–100.
- Lindsay WL (1991) Inorganic equilibria affecting micronutrients in soils. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM (eds) *Micronutrients in Agriculture*. SSSA Book Series No. 4. Madison, WI. pp. 89–112.

- Lindsay WL, Norvell WA (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421–428.
- Lönnerdal B (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 130, 1378S–1383S.
- Lönnerdal, B., 2000. Dietary factors influencing zinc absorption. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 130, 1378S–1383S.
- Lopez HW, Leenhardt F, Coudray C, Remesy C (2002). Mineral and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 727-739. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00618.x>
- Magen H (2008). Balanced crop nutrition: fertilizing for crop and food quality. *Turk J Agric For* 32: 183-193.
- Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol.* 2006;20:3–18. Doi: 10.1016/j.jtemb.2006.01.006.
- Maroto Borrego JV, Pomares García F, Baixauli Soria C (2007). El cultivo de la coliflor y el brócoli. Fundación Ruralcaja Valencia. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 335-347.
- Maroto Borrego JV. (1995). El cultivo del Brócoli en España. Evolución y principales problemáticas que plantea. *HF Hortoinformación*, nº 2: 27-37.
- Marschner H (1993) Zinc uptake from soils. In: Robson AD (ed) *Zinc in Soils and Plants*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 59–77.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd edn. Academic, London
- Martens DC, Westermann DT (1991) Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM (eds) *Micronutrients in Agriculture*. SSSA Book Series No. 4. Madison, WI. pp. 549–592.

- Martens DC, Westermann DT (1991). Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM (eds) *Micronutrients in Agriculture*. SSSA Book Series No. 4. Madison, WI. pp. 549–592.
- Mensink GB, Fletcher R, Gurinovic M, Serra-Majem L, Szponar L, Tetens I, et al. (2013). Mapping low intake of micronutrients across Europe. *The British Journal of Nutrition* 110: 755–773.
- Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C, García-Viguera C (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1508–1522.
- Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C, Garcia-Viguera C (2006). Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 41(5):1508-1522.
- Mortvedt JJ (1991). Micronutrient fertilizer technology. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM (eds) *Micronutrients in Agriculture*. SSSA Book Series No. 4. Madison, WI. pp. 89–112.
- Mortvedt JJ, Gilkes RJ (1993). Zinc fertilizers. In: Robson AD (ed) *Zinc in soils and plants*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 33–44.
- Mufarrege DJ, Aguilar DE (2001). Suplementación con zinc de los bovinos para carne en la provincia de Corrientes. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes, *Noticias y Comentarios*. N° 348.
- National Research Council Dietary (NRCD) (2001). Reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington DC. New York, 37-46.
- Norhaizan ME, Nor Faizadatul, AAW (2009). Determination of phytate, iron, zinc, calcium contents and their molar ratios in commonly consumed raw and prepared food in Malaysia. *Mal J Nutr* 15: 213-222.

- Nursal Tosun B, Yucean S (2007). Influence of home freezing and storage on vitamin C contents of some vegetables. *Pak J Nutr* 6: 472-477.
- O'Dell BL, de Boland AR, Koirtyohann SR (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 20, 718–721.
- O'Dell BL, de Boland AR, Koirtyohann SR (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 20, 718–721.
- Obrador A, Novillo J, Alvarez JM (2003). Mobility and availability to plants of two zinc sources applied to a calcareous soil. *Soil Sci Soc Am J* 67:564–572.
- Ogbede SC, Saidu AN, Kabiru AY, Busari MB (2015). Nutrient and anti-nutrient compositions of Brassica oleraceae var. Capitata L. *IOSR Journal of Pharmacy*, 5: 19-25.
- Ogbede SC, Saidu AN, Kabiru AY, Busari MB. (2015). Nutrient and anti-nutrient compositions of Brassica oleraceae var. Capitata L. *IOSR Journal of Pharmacy*, 5: 19-25.
- Ortega RM, Requejo AM, Andrés P, López-Sobales AM, Quintas ME, Redondo MR, Navia B, Rivas T (1997). Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *Am J Clin Nutr* 66:803–809
- Pechín GH, Cseh SB, Corbellini CN, Idiard JL, Moralejo RH, Visconti M, Drake M, Yarrar M (1999). Estudio de las deficiencias minerales en bovinos de carne en el departamento de Maracó, Provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Arg Prod Anim.* 15 (2): 492-494.
- Pfeiffer WH, McClafferty B (2007). HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop Sci.* 47, 88e105.
- Phattarakul N, Rerkasem B, Li LJ, Wu LH, Zou CQ, RamH, Sohu VS, Kang BS, Surek H, Kalayci M, Yazici A, Zhang FS, Cakmak I (2012). Biofortification of rice

grain with zinc through zinc fertilization in different countries. *Plant Soil* 361:131–141. doi:10.1007/s11104-012-1211-x

Poblaciones MJ, Rengel Z (2017). Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chemistry* 212: 427-433.

Potarzycki J, Grzebisz W (2009). Effect of zinc foliar application on grain yield of maize and its yielding components. *Plant, Soil and Environment*, 55: 519–527.

Prasad AS. (2003). "Zinc deficiency." *BMJ* 326(7386): 409-410.

Proexport. Memoria 2012. Asociación de productores y exportadores de frutas y hortalizas de la Región de Murcia (España). Citado por:: Rodríguez Hernández, M^a. C. (2013). Respuestas fisiológicas, moleculares y fitoquímicas de variedades de Brassica oleracea (Grupo Italica) sometidas a estrés abiótico. Tesis Doctoral. Directores: Martínez Ballesta, M^a. C. y Moreno Fernández, D. A. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.

Rattan RK, Deb DL (1981). Self-diffusion of zinc and iron in soils as affected by pH, CaCO₃, moisture, carrier and phosphorus levels. *Plant Soil* 63:377—393.

Reason DA, Watts MJ, Devez A, Broadley MR (2015). Quantification of phytic acid in grains, British Geological Survey Open Report, OR/15/070, 18pp.

Reason, D.A., Watts, M.J., Devez, A., Broadley, M.R. (2015). Quantification of phytic acid in grains, British Geological Survey Open Report, OR/15/070, 18pp.

Rengel Z, Batten GD, Crowley DE (1999). Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. *Field Crops Res* 60:27–40.

Rodríguez Hernández, M^a C (2013). Respuestas fisiológicas, moleculares y fitoquímicas de variedades de Brassica oleracea (Grupo Italica) sometidas a estrés abiótico. Tesis Doctoral. Directores: Martínez Ballesta, M^a. C. y Moreno Fernández, D. A.

Rosa DE, Fazio LE, Picco SJ, Furnus CC, Mattioli GA. Metabolism and zinc deficiency in cattle. *Analecta Veterinaria* (2008); 28 (2): 34-44.

- Rosa EAS, Haneklaus SH, Schnug E (2002). Mineral content of primary and secondary inflorescences of eleven broccoli cultivars grown in early and late seasons. *J. Plant Nutr.*, 25(8): 1741-1751. DOI: 10.1081/PLN-120006055
- Sadeghzadeh B (2013). A review of zinc nutrition and plant breeding. *J Plant Nutr Soil Sci* 13: 905-927.
- Sahito HA, Solangi AW, Lanjar AG, Solangi AH, Khuhro SA (2014). Effect of micronutrient (zinc) on growth and yield of mustard varieties. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 2: 105–113.
- Salama Z.A., Gaafar A.A., El Fouly M.M. (2015): Genotypic variations in phenolic, flavonoids and their antioxidant activities in maize plants treated with Zn (II) HEDTA grown in salinized media. *Agricultural Sciences*, 6: 397–405.
- Sánchez C, Lopez-Jurado M, Planells E, Llopis J, Aranda P (2009). Assessments of iron and zinc intake and related biochemical parameters in an adult Mediterranean population from southern Spain: influence of lifestyle factors. *J. of Nutritional Biochem.* 20:125–131.
- Sandstead HH, Penland JG, Alcock NW, Dayal HH, Chen XC, Li JS, Zhao F y Yang JJ. (1991). Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:470S–475S.
- Sarkar AN, Wyn Jones RG (1982). Effect of rhizosphere pH on the availability and uptake of Fe, Mn and Zn. *Plant Soil* 66:361–372.
- Sikora E, Cieślik E, Leszczyńska T, Filipiak-Florkiewicz A, Pisulewski PM (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem.*, 107: 55-59. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.023
- Sillanpaa M (1982). Micro nutrients and the nutrient status of soils. A global study. *FAO Soils Bulletin*, No.48, FAO, Rome.

- Sivakumar G, Aliboni A, Baccheta L (2007). HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. *Food Chem* 104: 1761-1764.
- Slosar M, Mezeyova I, Hegedúsova A, Andrejiová A, Kováčik P, Losak T, Kopta T. (2017). Effect of zinc fertilisation on yield and selected qualitative parameters of broccoli. *Plant, Soil and Environment*, 63(6), pp. 282-287
- Smith EJ, Hughes S, Lawlor AJ, Lofts S, Simona AJ, Stevens PA, et al. (2005). Potentially toxic metals in ombrotrophic peat along a 400 km English e Scottish transect. *Environ. Pol.* 136: 11-18.
- Terrés C, Navarro M, Martín-Lagos F, Giménez R, López H, López MC (2001). Zinc levels in foods from southeastern Spain: relationship to daily dietary intake. *Food Addit. Contam.* 8: 687-695.
- Thomson CA, Newton TR, Graver EJ, Jackson KA, Reid PM, Hartz VL, Cussler EC, Hakim IA (2007). Cruciferous vegetable intake questionnaire improves cruciferous vegetable intake estimates. *J. Am. Diet. Assoc.* 107, 631–641.
- Turhan H, Gul MK, Egesel CO, Kahrıman F (2011). Effect of sowing time on grain yield, oil content, and fatty acids in rapeseed (*Brassica napus* subsp. *oleifera*). *Turk J Agric For* 35: 225-234.
- Vallejo F, Tomás-Barberán FA, García-Viguera C (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *J. Sci. Food Agr.* 82: 1293-1297
- Valšíkova M, Červenka J, Barkoci Š, Sudzina M (2010). The evaluation of vitamin C content in fruits of vegetable pepper and tomato. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun* 58: 281-286.
- Velu G, Ortiz-Monasterio I, Cakmak I, Hao Y, Singh RP (2013) Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *J Cereal Sci* 59:365–372. doi:10.1016/j.jcs.2013.09.001

- Velu G, Ortiz-Monasterio I, Cakmak I, Hao Y, Singh RP (2014). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science* 59, 365-372.
- Velu, G, Ortiz-Monasterio I, Cakmak I, Hao Y, Singh RP (2014). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science* 59, 365-372.
- Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, de Schrijver R, Hansen M, Gerhauser C, Mithen R et al. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol Nutr Res* 53: S219-S265.
- Walkley A (1947). A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soil. Effect of variations in digestion conditions and inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63:251-263.
- Walter HL, Fanny L, Charles C; Christian R (2002). Minerals and phytic acid interaction: is it a real problem for human nutrition. *Int J Food Sc Tech* 37: 727-739.
- Wang YX, Specht A y Horst WJ (2012). Stable isotope labelling and zinc distribution in grains studied by laser ablation ICP-MS in an ear culture system reveals zinc transport barriers during grain filling in wheat, *New Phytol.*
- White PJ, Broadley MR (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plants Sci.* 10: 586-593.
- White PJ, Pongrac P, Sneddon CC, Thompson JA, Wright G (2018). Limits to the Biofortification of Leafy Brassicas with Zinc. *Agriculture* 8, 32.
- Wilkinson HF, Loneragan JF, Quick JP (1968). The movement of zinc to plant roots. *Soil Sci Soc Amer Proc* 32:831-833.
- Wilt HD y Carlson MS (2009). Efecto de los suplementos con óxido de Zinc y biotina con o sin carbadox. *Journal of Animal Science* 2009. 87:3253-3258.

- World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO (2009) *Global Health Risks*, World Health Organization, pp 1–70
- Wu P, Tian JC, Walker CE, Wang FC (2009). Determination of phytic acid in cereals a brief review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1671–1676.
- Wu, P., Tian, J.C., Walker, C.E., Wang, F.C., 2009. Determination of phytic acid in cereals a brief review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1671–1676.
- Xue YF, Yue SC, Zhang YQ, Cui ZL, Chen XP, Yang FC, Cakmak I, McGrath SP, Zhang FS, Zou CQ (2012). Grain and shoot zinc accumulation in winter wheat affected by nitrogen management. *Plant Soil* 361:153–163.
- Yilmaz A, Ekiz H, Torun B, Gultekin I, Karanlik S, Bagci SA, Cakmak I (1997) Effect of different zinc application methods on grain yield and zinc concentration in wheat grown on zinc-deficient calcareous soils in Central Anatolia. *J Plant Nutr* 20:461–471.
- Yilmaz A, Ekiz H, Gültekin I, Torun B, Barut H, Karanlik S, (1998). Effect of seed zinc content on grain yield and zinc concentration of wheat grown in zinc-deficient calcareous soils. *J Plant Nutr*; 21:2257–64.
- Zhang YQ, Sun YX, Ye, YL, Karim, MR, Xue YF, Yan P et al. (2012). Zinc biofortification of wheat through fertilizers applications in different locations of China. *Field Crops Res.* 125:1–7.
- Zhao FJ, Su YH, Dunham SJ, Rakszegi M, Bedo Z, McGrath SP, Shewry PR (2009). Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *J. of Cereal Sci.* 49:290–295.
- Zou CQ, Zhang YQ, Rashid A, Ram H, Savasli E, Arisoy RZ, Ortiz-Monasterio I, Simunji S, Wang ZH, Sohu V, Hassan M, Kaya Y, Onder O, Lungu O, Yaqub Mujahid M, Joshi AK, Zelenskiy Y, Zhang FS, Cakmak I (2012) Biofortification of wheat with zinc through zinc fertilization in seven countries. *Plant Soil* 361:119–130.