



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

MODALIDAD: TRABAJO DE TITULACIÓN

Título:

“Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magister en Desarrollo Local

Autor:

Claudio Pruna Darwin Rodrigo

Tutor:

Ing. Eliana Granja, Mgt.

LATACUNGA –ECUADOR

2023

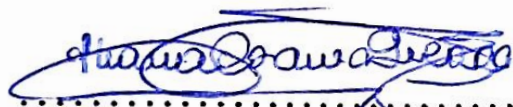
APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)” presentado por Claudio Pruna Darwin Rodrigo, para optar por el título magíster en Sanidad Vegetal.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, 30 de agosto, 2023



.....

Ing. Eliana Granja, Mgt.
C.C. 1718126301


APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación: “Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)”, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Desarrollo Local; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

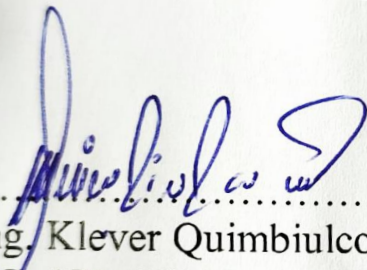
Latacunga, 30 de agosto, 2023.



.....
Ing. Giovana Paulina Parra Gallardo., Mg
CC: 1718126301



.....
Ing. Francisco Hernan Chancusig., Mg
CC: 0501883920
Lector 3



.....
Ing. Klever Quimbiulco., PhD
CC: 1709561102
Lector 2

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación a igual que mi vida, está dedicado a Dios, mi refugio en esta aventura de vivir, a mis padres, hermanas y cuñado, a mis sobrinos que son mi inspiración para dejarles un legado de ejemplo de trabajo y perseverancia.

A mis profesores, familiares y estudiantes de la carrera agropecuaria IASA I, que extendieron su mano en el momento justo y en la cantidad necesaria para brindar la ayuda que necesitaba.

A Miyuki Fujisawa (+). Su cariño, la alegría, paciencia, entrega y entusiasmo puedo verlo día a día cuando alzo mi vista al cielo.

A mamá a papá (+), y a todos aquellos que no nombro pero que están presentes en espíritu.

Darwin Rodrigo Claudio Pruna.

AGRADECIMIENTO

A Dios y padre de nuestro Sr. Jesucristo, por mostrarme el camino a seguir, a mis padres, Gerardo y María, que siempre están presentes, cuando más los necesito.

A mis hermanas y cuñado por su cariño y apoyo incondicional, sus oraciones y consejos, son el engranaje perfecto, que, en conjunto armonioso con mis sobrinos, ponen en marcha esa voz interior que dice, nunca te rindas.

A todos mis profesores en especial a la Ing. Eliana Granja Mgt. al Ing. César Falconí. PhD., a los Ingenieros: Siomara, Juanita, Kate, Anita, Pamela, Oswaldo, Jordy, Mario, Joshue, Klever, Henry y Álvaro, mil gracias, estaré eternamente agradecido

Darwin Rodrigo Claudio Pruna.

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación. “Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)”

Latacunga, 30 de agosto, 2023



.....
Darwin Rodrigo Claudio Pruna
CI. 1712448339

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente trabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, 30 de agosto 2023



.....
Darwin Rodrigo Claudio Pruna
CI. 1712448339

AVAL DEL VEEDOR

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: **“Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)”** contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los lectores en sesión científica del tribunal.

Latacunga, 30 de agosto, 2023



.....
Ing. Giovana Paulina Parra Gallardo., Mg
CC: 1718126301

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

Título: “Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)”

Autor: Claudio Pruna Darwin Rodrigo

Tutor: Ing. Eliana Granja, Mgt.

RESUMEN

Los mecanismos de acción de *B. subtilis* permiten el desarrollo de parámetros bioquímicos y morfológicos en los cultivos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos cepas de *B. subtilis* comercial en la promoción de crecimiento y control de enfermedades en plantas de cáñamo por tres meses en el invernadero de Fitopatología y Control biológico de la Carrera Agropecuaria IASA. Inicialmente se desinfectaron e inocularon (1×10^6 UFC/ml) ocho semillas de cáñamo por tratamiento (T1: *B. subtilis* CtpxS3-5, T2: *B. subtilis* CtpxS2-1 y T3: agua destilada) para posteriormente ser trasplantadas en rizotrones. Los resultados obtenidos en la fase de invernadero *B. subtilis* CtpxS3-5 obtuvo mayor altura de 79,71 cm; y la cepa CtpxS2-1 presentó mayor contenido de clorofila con 32,07 unidades de CCI. Con respecto a las pruebas bioquímicas el efecto inhibitorio de *B. subtilis* CtpxS3-5 presenta menor diámetro de la colonia de *Fusarium spp*; La fijación de nitrógeno a partir de siembra por agotamiento de las cepas y sustrato de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 evidenciaron crecimiento de la bacteria en medio Ashby y en el medio Pikovskaya evidenciaron cambio de color positivo alrededor de las colonias; La cepa CtpxS3-5 presentó mayor contenido de proteína de 5,07 mg/g de material fresco, sólidos solubles totales (SST) de 5,38 mg/g y mayor Unidades Formadoras de Colonia de 6,23 log₁₀(UCF/g); el contenido de AIA de 1,32 mg/ml y el contenido de Chla+b de 24,99 (ug/ml) fue mayor en las plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1.

PALABRAS CLAVE: *B. subtilis*; promoción de crecimiento; control enfermedades

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

Title: “Effect of *Bacillus subtilis* on the promotion of plant growth and diseases in the rhizosphere of hemp plants (*Cannabis sativa*)”

Author: Claudio Pruna Darwin Rodrigo

Tutor: Emerson Jácome

ABSTRACT

The mechanisms of action of *B. subtilis* allow the development of biochemical and morphological parameters in crops. The objective of this study was to evaluate the effect of two strains of commercial *B. subtilis* in promoting growth and controlling diseases in hemp plants for three months in the Phytopathology and Biological Control greenhouse of the IASA Agricultural Career. Initially, eight hemp seeds per treatment were disinfected and inoculated (1×10^6 CFU/ml) (T1: *B. subtilis* CtpxS3-5, T2: *B. subtilis* CtpxS2-1 and T3: distilled water) to later be transplanted into rhizotrons. The results obtained in the greenhouse phase *B. subtilis* CtpxS3-5 obtained a greater height of 79.71 cm; and the CtpxS2-1 strain presented a higher chlorophyll content with 32.07 CCI units. Regarding the biochemical tests, the inhibitory effect of *B. subtilis* CtpxS3-5 presents a smaller diameter of the *Fusarium* spp colony; Nitrogen fixation from sowing by depletion of the strains and substrate of *B. subtilis* CtpxS2-1 and CtpxS3-5 showed growth of the bacteria in Ashby medium and in Pikovskaya medium they showed positive color change around the colonies; The CtpxS3-5 strain presented a higher protein content of 5.07 mg/g of fresh material, total soluble solids (TSS) of 5.38 mg/g and higher Colony Forming Units of $6.23 \log_{10}$ (UCF/g); the IAA content of 1.32 mg/ml and the Chla+b content of 24.99 (ug/ml) was higher in the plants treated with *B. subtilis* CtpxS2-1.

KEYWORDS: *B. subtilis*; growth promotion; disease control

Rueda Flores Mayra Alexandra con cédula de identidad número: 050340110-1 Licenciada en: CIENCIAS DE LA EDUCACION MENCION INGLÉS con número de registro de la SENESCYT: 1020-14-1262388 ; **CERTIFICO** haber revisado y aprobado la traducción al idioma inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: “**Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal y de enfermedades en rizosfera de plantas de cáñamo (*Cannabis sativa*)**” de: Claudio Pruna Darwin Rodrigo aspirante a magister en Sanidad Vegetal.

Latacunga, septiembre, 3, 2023



.....
Lic. Rueda Flores Mayra Alexandra
050340110-1

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
CERTIFICO.....	ii
APROBACIÓN TRIBUNAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA.....	vi
RENUNCIA DE DERECHOS	vii
AVAL DEL VEEDOR.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xi
INDICE DE TABLAS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Justificación.....	1
Planteamiento del problema.....	2
Formulación del problema.....	3
Hipótesis	3
Objetivos de la investigación.....	3
Objetivo General	3
Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO I.	5
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	5
1.1. El cultivo de cáñamo.....	5
1.1.1. Origen.....	5
1.1.2. Situación legal del Cáñamo en el Ecuador	6
1.1.3. Taxonomía y morfología del cultivo.....	6
1.1.4. Etapas fenológicas de Cáñamo (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	8
1.1.5. Enfermedades del cultivo	9

1.2. <i>Bacillus subtilis</i>	18
1.2.1. Promotor de crecimiento	18
CAPÍTULO II	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. Ubicación del lugar de investigación.....	24
2.1.1. Ubicación Política	24
2.2. Materiales, Insumos y Equipos	25
2.2.1. Reactivos	25
2.2.2. Medios de cultivo.....	25
2.2.3. Biológicos.....	26
2.3. Instalación del cultivo	26
2.4. Métodos.....	27
2.4.1. Fase de invernadero.....	27
2.4.2. Variables a evaluar.....	28
2.4.3. Factores en estudio	36
2.4.4. Codificación de tratamientos	37
2.5. Análisis estadístico	37
CAPÍTULO III.....	38
RESULTADOS Y DISCUSION	38
3.1.1. Fase de invernadero.....	38
3.1.2. Fase de laboratorio	40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
Conclusiones	48
Recomendaciones.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Taxonomía de Fusarium (F. oxysporum)</i>	10
Tabla 2 <i>Taxonomía de Botrytis (B.cinerea).</i>	12
Tabla 3 <i>Temperaturas ideales para cada fase del ciclo de B. cinerea</i>	13
Tabla 4 <i>Taxonomía de Rhizoctonia (R. solani).</i>	16
Tabla 5. <i>Descripción de los tratamientos</i>	26
Tabla 6 <i>Curva estándar para la determinación de proteína por espectrofotometría</i>	32
Tabla 7 <i>Estándares para la curva de calibración de AIA</i>	32
Tabla 8 <i>Codificación de los tratamientos.</i>	37
Tabla 9 <i>Diseño del esquema del ADEVA</i>	37
Tabla 10 <i>Promedio ± desviación estándar de Unidades de CCI de B. subtilis cepa Ctpx2-1, Ctpx3-5 y testigo en hojas de cáñamo</i>	39
Tabla 11 <i>Crecimiento de Fusarium spp en pruebas duales in vitro IASA, 2023</i>	40
Tabla 12 <i>Promedio ± desviación estándar de AIA (mg/ml) en raíces de cáñamo al final de la fase experimental.</i>	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Identificación morfológica entre sexos</i>	7
Figura 2 <i>Ciclo de vida de Fusarium sp.</i>	10
Figura 3 <i>Síntomas y signos de Fusarium sp</i>	11
Figura 4 <i>Ciclo de vida de Botrytis cinerea</i>	14
Figura 5 <i>Síntomas de infección de cannabis cultivados en invernadero por Botrytis cinerea.</i>	15
Figura 6 <i>Podredumbre marrón o moho gris causado por Botrytis cinerea</i>	15
Figura 7 <i>Ciclo de vida de R. solani</i>	17
Figura 8 <i>Síntomas y signos por R. solani</i>	18
Figura 9 <i>Ubicación laboratorio de Fitopatología y Control Biológico del IASA</i>	24
Figura 10 <i>Diseño experimental del ensayo en invernadero</i>	27
Figura 11 <i>Establecimiento de plántulas de cáñamo en invernadero</i>	28
Figura 12 <i>Esquema utilizado en pruebas duales in vitro</i>	29
Figura 13 <i>Cuantificación de proteína en hojas frescas de cáñamo</i>	31
Figura 14 <i>Cuantificación de ácido indol acético (AIA) en muestras de raíces de cáñamo</i>	33
Figura 15 <i>Determinación del índice clorofila en hojas frescas de C. sativa</i>	34
Figura 16 <i>Sólidos solubles totales (SST) de hojas frescas de C. sativa</i>	35
Figura 17 <i>Dinámica poblacional de la rizósfera inoculada con B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5</i>	36
Figura 18 <i>Altura de las plantas de cáñamo (cm) durante tres meses de aplicación</i>	38
Figura 19 <i>Colonia de Fusarium spp en medio PDA a 25 grados centígrados durante 7 días en incubadora</i>	40
Figura 20 <i>Inoculaciones en medio Ashby Manitol de B. subtilis (1x10³ UFC/ml)</i>	41
Figura 21 <i>Inoculaciones en medio Pikovskaya de B. subtilis (1x10³ UFC/ml)</i>	42
Figura 22 <i>Efecto de B. subtilis en el contenido protéico (mg/g) en hojas frescas de C. sativa al final de la fase experimental</i>	43

Figura 23 <i>Efecto de B. subtilis en la promoción de crecimiento en los promedios y límites superiores e inferiores de auxinas (mg/ml) en hojas de C. sativa al final de la fase experimental.....</i>	44
Figura 24 <i>Efecto de B. subtilis en el contenido de clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y clorofila total (Chla+b) en hojas de C. sativa.....</i>	45
Figura 25 <i>Efecto de B. subtilis en la promoción de crecimiento en los promedios y límites superiores e inferiores de sólidos solubles totales (mg/g) en hojas de C. sativa al final de la fase experimental..</i>	46
Figura 26 <i>Dinámica poblacional de inoculaciones periódicas de cepas de B. subtilis Ctpx2-1 y Ctpx3-5, en la rizósfera de plantas de cáñamo a lo largo de tres meses</i>	47

INTRODUCCIÓN

Justificación

En Ecuador, el uso del cannabis no psicoactivo y cáñamo industrial, se despenalizó a través de una reforma al Código Integral Penal (COIP), y especifica que el contenido de delta-9-tetrahidrocannabinol conocido como THC, debe ser menor al 1% en peso seco, de esta forma, apunta a la reactivación económica del sector productivo del país, después de una crisis causada por el SARS-CoV-2 y la enfermedad del COVID-19 (pandemia), y de esta forma generar investigación, desarrollo de la industria y crear miles de empleos.

La productividad del cultivo de cáñamo está afectada por el embate de ciertos hongos que están presentes en todas las etapas fenológicas del cultivo, *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *Macrophomina phaseolina*, y *fusarium spp.*, entre los principales síntomas asociadas son: el marchitamiento vascular, podredumbre radicular, podredumbre del pie y del tallo y lesiones en hojas, de la misma forma, está asociada a la descomposición en postcosecha y a disminuir la calidad de la semilla.

El control de estas enfermedades de forma convencional es a base de agroquímicos que generan toxicidad para las personas, animales y la insensibilidad de los patógenos, adicional a ello, aceleran la formación de suelos salinos.

En consecuencia, el daño que causa al ambiente el uso excesivo de productos sintéticos que dejan a su paso residuos químicos, ha creado la necesidad de mejorar y proteger al cultivo de cáñamo, de esta manera se propone el uso de *Bacillus subtilis* (cepas comerciales) como una alternativa válida para inducir el crecimiento de las plantas, controlar las enfermedades fungosas a nivel de la rizosfera y reducir

o eliminar el uso de productos sintéticos que causan problemas fundamentales a la naturaleza misma de la vida.

Planteamiento del problema

Las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) son bacterias que se encuentran en la rizósfera, es decir, en la superficie de raíces y en asociación con las raíces, facilitando la absorción de nutrientes en ciertas plantas, mediante la realización de varias funciones como: fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, inducción de sustancias promotoras de crecimiento como el ácido indol acético, producción de sideróforos, así como antagonistas contra microorganismos fitopatógenos controlando enfermedades de las plantas, entre otras, características que han facilitado la utilización de bacterias como biofertilizantes en los cultivos con el fin de mejorar su calidad y productividad (Yadav et al., 2010).

La producción de biofertilizantes inició a finales del siglo XIX, enfocándose en la capacidad metabólica de los microorganismos en degradar nutrientes y ayudar a la fertilización de los suelos, particularmente en la fijación de nitrógeno donde existe una interacción de microorganismos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella*, que lo fijan por asociación y algunos que forman simbiosis como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Corrales et al., 2017).

En algunos estudios realizados por Hayes y colaboradores en el año 2000 demostraron que algunas bacterias solubilizadoras de fosfato inoculadas en las plantas tienen la capacidad de adicionar fitasas purificadas en las raíces de las plantas permitiendo la solubilización de fósforo, contribuyendo con el crecimiento de la planta (Corrales et al., 2017)

Yáñez & Falconí, (2018) mencionaron que a partir de *Lupinus mutabilis* aislaron dos cepas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y *B. subtilis* Ctpx3-5 como controladores biológicos, evidenciando la eficiencia en el control de antracnosis en chocho Andino causada por *C. acutatum*. Estudios posteriores mostraron la capacidad de estos Bacilos en expresar genes asociados en el crecimiento como superóxido dismutasa o genes precursores de la resistencia vegetal (Yáñez & Falconí, 2021).

A su vez, en la crisis de 1970 debido a la alta contaminación por fertilizantes nitrogenados se llevó a cabo investigaciones sobre métodos para fijar nitrógeno en el suelo por su acción simbiótica sobre el sistema *Rhizobium* de las leguminosas (Corrales et al., 2017).

En este sentido, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal es una opción necesaria para el mejoramiento de los cultivos, del suelo y del ambiente.

El complejo de hongos a nivel de rizosfera afecta directamente al rendimiento y al bolsillo del productor que se dedica al cultivo de cáñamo, advirtiendo al peligro al que está expuesto el agricultor.

Formulación del problema

¿Cuál sería el efecto de *B. subtilis* sobre la promoción de crecimiento y control de enfermedades en la rizosfera de plantas de cáñamo? En esencia, se trata de reducir o eliminar el uso de productos sintéticos y contribuir al manejo de enfermedades fungosas del cultivo de cáñamo. Esta propuesta está enmarcada en la línea de Análisis, Conservación y Aprovechamiento de la biodiversidad, Seguridad Alimentaria, Administración y Economía para el Desarrollo Humano y Social.

Hipótesis

H1: Cepas de *B. subtilis* comercial CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promueven el crecimiento y controlan enfermedades nivel de rizosfera en plantas de cáñamo por acción enzimática fitasas y nitrogenasas.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Evaluar el efecto de dos cepas de *B. subtilis comercial* en la promoción de crecimiento y control de enfermedades en plantas de cáñamo.

Objetivos específicos

- Evaluar *in vitro* la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium spp.* a nivel de rizósfera.
- Evaluar algunos mecanismos directos en la promoción de crecimiento vegetal.
- Determinar el crecimiento de plantas de cáñamo por efecto de *B. subtilis* por acción enzimática

CAPÍTULO I.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. El cultivo de cáñamo

1.1.1. Origen

El cáñamo es un cultivo industrial con diversos usos, es cultivada en regiones templadas y tiene un alto potencial de rendimiento económico en lo que respecta a la producción de sus semillas y fibra, razón por la que existe gran interés en el cultivo a nivel internacional, La creciente demanda mundial de los productos de esta planta ha hecho que se convierta en un pilar fundamental en la economía agrícola de muchos países, donde su cultivo es legal (Wimalasiri *et al.*, 2021).

El mercado mundial del cáñamo está representado por alrededor de 25 000 productos, de diferente índole. Como un cultivo de fibra o cáñamo, se ha usado para la elaboración de ropa, telas, papel, etc. Los productos de cáñamo también son usados en las constructoras, ya que en esta industria se elaboran materiales de aislamiento y muebles con su fibra e incluso ha llegado hasta el mercado automotriz formando parte de motores y combustibles. Como cannabis, ha sido usado en la industria farmacéutica donde se ha fabricado una gran variedad de medicamentos mediante el uso de plantas con cantidades inferiores al 1% de THC en peso seco. Por otro lado, también se ha hecho uso de las semillas del cáñamo para la extracción de aceite al que se le ha otorgado múltiples usos, especialmente dentro de las industrias cosmética, farmacéutica y alimenticia (Crini *et al.*, 2020).

1.1.2. Situación legal del Cáñamo en el Ecuador

El 17 de septiembre del 2019 la Asamblea Nacional del Ecuador aprobó la reforma del Código Orgánico Integral Penal (COIP) para el uso del cannabis con fines medicinales o terapéuticos permitiendo únicamente el cultivo y procesamiento del cáñamo industrial. Posteriormente, el 19 de octubre de 2020 el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador expide el Acuerdo Ministerial No.109, donde se especifica los procesos de siembra, cosecha, procesamiento, comercialización y exportación de cannabis no psicoactivo o cáñamo para uso industrial, cuya concentración de THC (delta-9-Tetrahidrocannabinol) sea menor al 1 % en peso seco (Figura 1). Adicionalmente en el Acuerdo Ministerial No. 141 se detallan las tarifas a pagar por cada licencia que sea solicitada por el interesado de acuerdo a su necesidad como la importación, siembra, producción, procesamiento, comercialización, adquisición, exportación de cannabis no psicoactivo o cáñamo para uso industrial (LASA, 2021).

1.1.3. Taxonomía y morfología del cultivo

Cannabis sativa es una planta perteneciente a la familia *Cannabaceae*, herbácea anual con un tallo erecto de 3 a 4 m de alto estriado longitudinalmente, sus hojas son palmadas estipuladas, las hojas superiores son alternas y las inferiores opuestas, las hojas se encuentran sobre los peciolo formando de 3 a 9 folíolos de 7 cm de largo, los mismos que son angostos, de ápice agudo, pelillos suaves y tricomas glandulares sobre el haz (Ángeles *et al.*, 2014).

Los tricomas son prolongaciones de la epidermis que se encuentran principalmente en las inflorescencias almacenando la mayor cantidad de cannabinoides y terpenos, son encargados de absorber agua, regular la temperatura y segregar resinas (mecanismo de defensa). Determinan el punto de madurez de la planta, pasando por cuatro cambios, a) tricomas blanquecinos, cuando alcanzan los niveles máximos de cannabinoides THC (Δ 9-tetrahidrocannabinol), b) Tricomas transparentes, indican el inicio de la biosíntesis de cannabinoides, c) Tricomas color ámbar, hay un efecto mixto de cannabinoides alrededor del 10 al 20% maduros se pueden recolectar, c) Tricomas ámbar/ marrón, son indicadores que finalizó la cosecha y los niveles de THC (Δ 9-tetrahidrocannabinol) han disminuido (Porrás, 2021).

Las inflorescencias en las hojas superiores se encuentran brácteas herbáceas y glandulosas, las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con gran número de flores, y las femeninas son densas con pocas flores (5 a 8). Las flores masculinas son pediceladas, con perianto de 5 tépalos y las femeninas tienen el perianto entero pegado al ovario, presente en el fruto, un ovulo y dos estigmas. Las flores hermafroditas cerca de la cosecha presentan estigmas colapsados y carpelos hinchados y con granos de polen (Porrás, 2021)

Las semillas se forman en las flores femeninas, tras la polinización maduran entre 30 y 45 días, el fruto es aquenio, con una sola semilla de forma ovoide encerrado en el perianto (Hanan & Mondragón, 2009).

La identificación morfológica entre ambos sexos se describe en los machos presentan sacos polínicos que tienen forma de un racimo de bolitas en la base de las ramas laterales, que al abrirse dispersan el polen para la fertilización a las hembras; las hembras producen flores llamadas cogollos donde se concentra su contenido de THC, presentan pequeños calices, estilo (pelos estigmáticos) y el estigma (captan el polen) que forman parte del gineceo o pistilo (Figura 1).



Figura 1 Identificación morfológica entre sexos

Fuente: Porrás (2021)

Es importante evitar la polinización, debido a que el pistilo entra en contacto con el polen, el cáliz se destruirá en el ovario y comenzará a producir frutos secos y

posteriormente semillas en vez de cogollos, es decir las flores pistiladas acompañadas de la formación de anteras forman semillas no deseadas (Porrás, 2021).

1.1.4. Etapas fenológicas de Cáñamo (*Cannabis sativa* L.)

Según Mishchenko *et al.*, (2017a), el cáñamo tiene nueve estadios principales que deben ser bien identificados para una adecuada planificación de aplicaciones fertilizantes y control de plagas además de las labores culturales del cultivo.

1.1.4.1. Etapa principal de crecimiento 0: Germinación y brotación

Esta etapa se describe desde el estadio 0 cuando la semilla del cáñamo se encuentra en estado seco hasta el estadio 9 donde se ha presenciado la imbibición completa de las semillas y la presencia de la radícula, hasta su estado de emergencia en el que los cotiledones han surgido del sustrato en el que han sido sembradas.

1.1.4.2. Etapa principal de crecimiento 1: Desarrollo de la hoja

En esta fase se presencia el despliegue completo de los cotiledones y la aparición de las primeras hojas, esta etapa va desde el estadio 10 hasta el 19. En el estadio 11 se puede encontrar un par de hojas verdaderas simples y a partir del 12 hasta el 19 se podrá observar hojas compuestas, al final de esta etapa se va a encontrar más de 9 pares de hojas verdaderas en la planta.

1.1.4.3. Etapa principal de crecimiento 2: Formación de brotes laterales

Esta fase se caracteriza porque se hace visible el primer brote lateral en el estadio 21 y para el estadio 25 se pueden encontrar múltiples brotes laterales en la base de la hoja.

1.1.4.4. Etapa principal de crecimiento 3: Alargamiento del tallo

El tallo presenta un crecimiento continuo que aumenta de manera exponencial, a partir del estadio 21 el tallo ha crecido un 10% y para el estadio 39 el tallo ha desarrollado un 90% de la longitud total de la planta.

1.1.4.5. Etapa principal de crecimiento 5: Aparición de la inflorescencia

Para el estadio 51 se hacen visibles los primeros botones florales individuales de las flores masculinas y en 4 días más su presencia será masiva. Al estadio 59 serán evidentes las 5 partes principales de las flores masculinas, aunque sus capullos todavía estarán cerrados.

1.1.4.6. Etapa principal de crecimiento 6: Floración

Al estadio 60, empiezan a abrirse las primeras flores individuales de la planta y para el estadio 65 el 50% de ellas estarán abiertas, en este momento se considera que la floración se ha completado, después de 3 estadios se finaliza la floración con el 70% de las flores abiertas.

1.1.4.7. Etapa principal de crecimiento 7: Desarrollo del fruto

En esta etapa empieza la formación del fruto del cáñamo y para el estadio 79 la mayoría de los frutos alcanzan el tamaño y el color definitivo.

1.1.4.8. Etapa principal de crecimiento 8: Maduración del fruto

Los estadios desde el 81 hasta el 89 presentan la maduración del fruto hasta el momento de su recolección.

1.1.4.9. Etapa principal de crecimiento 9: Senescencia

En este estadio se aprecia la caída de las hojas superiores ya que el 50% de ellas estarán muertas y para el estadio 99 se podrá cosechar el producto.

1.1.5. Enfermedades del cultivo

Según Patiño *et al.*, (2022), entre las enfermedades causadas por hongos reportadas como patógenos en plantas de *C. sativa* son *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*.

1.1.5.1. *Fusarium spp.*

Fusarium es un hongo imperfecto cosmopolita, distribuido en el suelo, restos de vegetales infectados y partes de plantas aéreas o subterráneas, estableciéndose con mayor agresividad en climas húmedos y humedad baja. Son saprófitos en algunas fases de su ciclo vital y a su vez pueden tener o no una reproducción sexual propia de los teleomorfos del orden Hypocreales de la división Ascomycota (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía de *Fusarium* (*F. oxysporum*)

División: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Nectriaceae
Género: *Fusarium*
Especie: *F. oxysporum*

Fuente: Patiño et al. (2022)

1.1.5.1.1. Ciclo de vida

Fusarium tiene un ciclo de vida monocíclico debido a que las infecciones secundarias dependen del inóculo en la planta; después de la plasmogamia y cariogamia como proceso previo a la reproducción sexual (meiosis), el peritecio forma esporas recombinantes y clonales respectivamente, dando lugar a un micelio haploide (HM), permitiendo que las macro y micro conidias colonicen a los huéspedes directamente y las clamidiosporas puedan permanecer en peritecio hasta que las condiciones para colonización sean favorables para reiniciar con su ciclo (Figura 2) (Dweba et al., 2017).

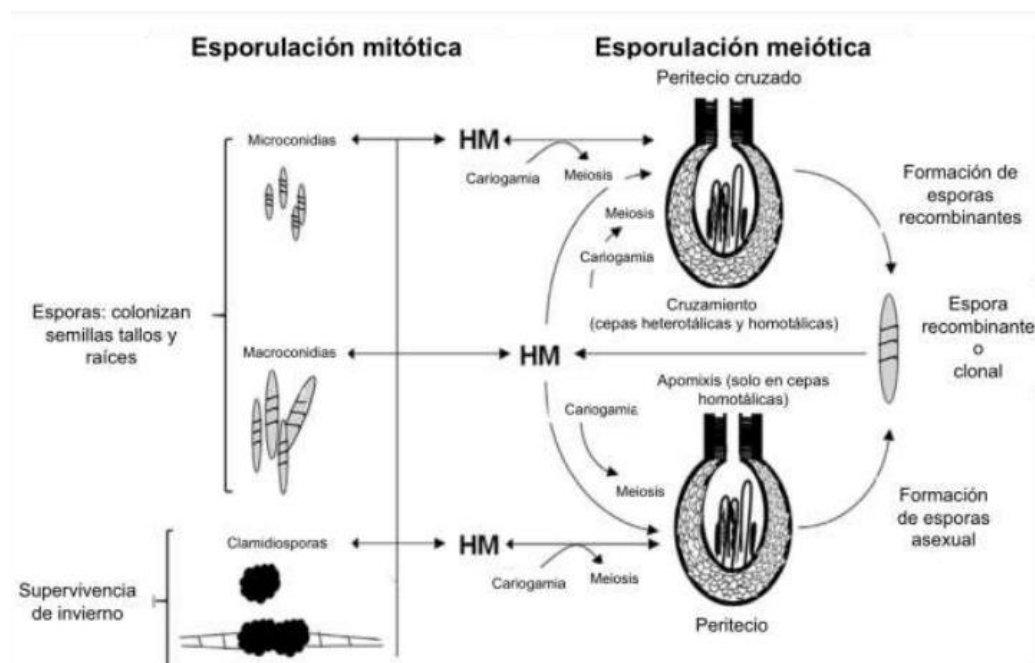


Figura 2 Ciclo de vida de *Fusarium* sp.

Fuente: Dweba et al. (2017)

1.1.5.1.2. Síntomas de *Fusarium spp.*

Los síntomas de *Fusarium sp.* dependen de la etapa de producción de la planta, al inicio del ciclo del cultivo (esquejes) puede provocar "Damping off", ocasionando pudrición en su base (Figura 3a), lesiones de color negro o marrón y marchitamiento en plantas trasplantadas al campo; en plantas adultas puede generar marchitamiento y moho en la flor presentándose manchas rojizas o masas de micelios rosados o blancos que crecen en la copa de la planta, durante sus últimas fases productivas, de cosecha y pre secado (Dweba *et al.*, 2017)

Además, en etapas vegetativas inicia con la podredumbre de la raíz germinando y penetrando las clamidosporas o conidios en xilema, reduciendo el movimiento de agua debido al taponamiento del tejido, siendo desapercibido hasta que empieza el debilitamiento en la base de los tallos, como también, la producción de toxinas que hacen que las hojas se tornen amarillentas.

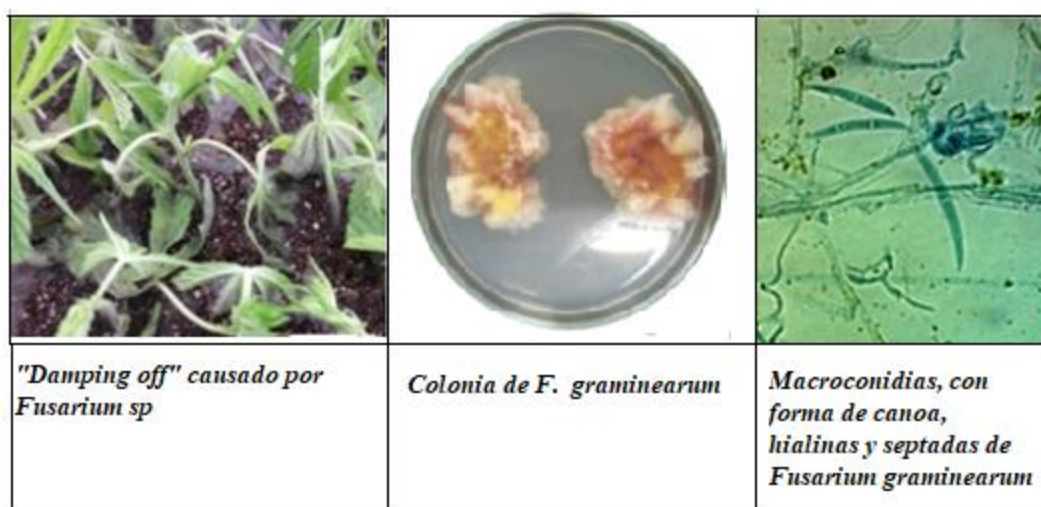


Figura 3 Síntomas y signos de *Fusarium sp*

Fuente: Patiño *et al.* (2022)

1.1.5.1.3. Signos de *Fusarium spp.*

Fusarium es un hongo del suelo que produce dos tipos de espóra asexuales: a) macroconidios, son ligeramente curvados, de paredes delgadas, con tres o cuatro septos (Figura 3c), b) microconidios, son elipsoidales y clamidiosporas con doble pared gruesa, lisa o rugosa (Patiño *et al.*, 2022).

La marchitez causada por *Fusarium* incluye afectación en actividades fisiológicas como: acumulación de micelos en la xilema formando tilosas, producción de micotoxinas especialmente en granos (zearalenona, fumonisina, moniliformina y tricotecenos), inactivación de defensas y desbalance de nitrógeno y potasio (N: K) (Patiño *et al.*, 2022).

1.1.5.2. *Botrytis cinerea*

Hongo filamentoso perteneciente a la familia Moniliaceae (Tabla 2), con amplia variedad de huéspedes por ser patógeno, se desarrolla saprofiticamente en tejidos verdes, necróticos y senescentes (Elad *et al.*, 2007), causando el moho gris”. La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* es de 15 °C, y con niveles de humedad mayor al 60 % (Bravo & Castillo, 2005).

Tabla 2 Taxonomía de *Botrytis (B.cinerea)*.

División: Amastigomycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase: Deteromycolina
Subclase: Hyphomycetidae
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: <i>Botrytis</i>
Especie: cinérea

Fuente: Elad *et al.* (2007)

1.1.5.2.1. Ciclo de la enfermedad

El hongo puede permanecer en el suelo como esclerocio hasta dar inicio con el proceso de germinación a una temperatura de 22 °C (Tabla 3) y penetración en 2 a 3 horas, desarrollándose de dos formas: sexual como apotecios que cierran las ascosporas y de forma asexual como los conidios. El ciclo de vida dependiendo del tejido huésped puede establecerse entre 3 a 4 días, comenzando con la producción de conidios y la germinación de estas esporas cuando caen en la superficie de la planta huésped (Elad *et al.*, 2007).

Tabla 3 Temperaturas ideales para cada fase del ciclo de *B. cinerea*

Fase del ciclo de vida	Temperatura oC
Crecimiento del micelio	22
Esporulación	15
Germinación de esporas	20
Crecimiento del tubo de germinación	30
Formación de esclerocios	11-13
Germinación de esclerocios	22-24

Fuente: García (2017)

Según Martínez & Moreno (2008) el ciclo de infección de *B. cinerea* puede ser producido sobre cualquier material vegetal y transportados a grandes distancias por corrientes de aire, agua, lluvia, polen y por actividad física o mecánica hasta alcanzar la superficie del hospedero conformado por varias fases: a) Adhesión y germinación de los conidios sobre el hospedero, b) Penetración en el tejido vegetal por aberturas o heridas mediante actividades mecánicas o enzimáticas, c) Establecimiento del patógeno en la zona de penetración, ocasionando muerte de células adyacentes al lugar de penetración como también provocando mecanismos de defensa en la planta, d) Fase de latencia donde la planta realiza al parecer mecanismos de defensa en áreas necróticas conocidas como áreas primarias (Figura 4)

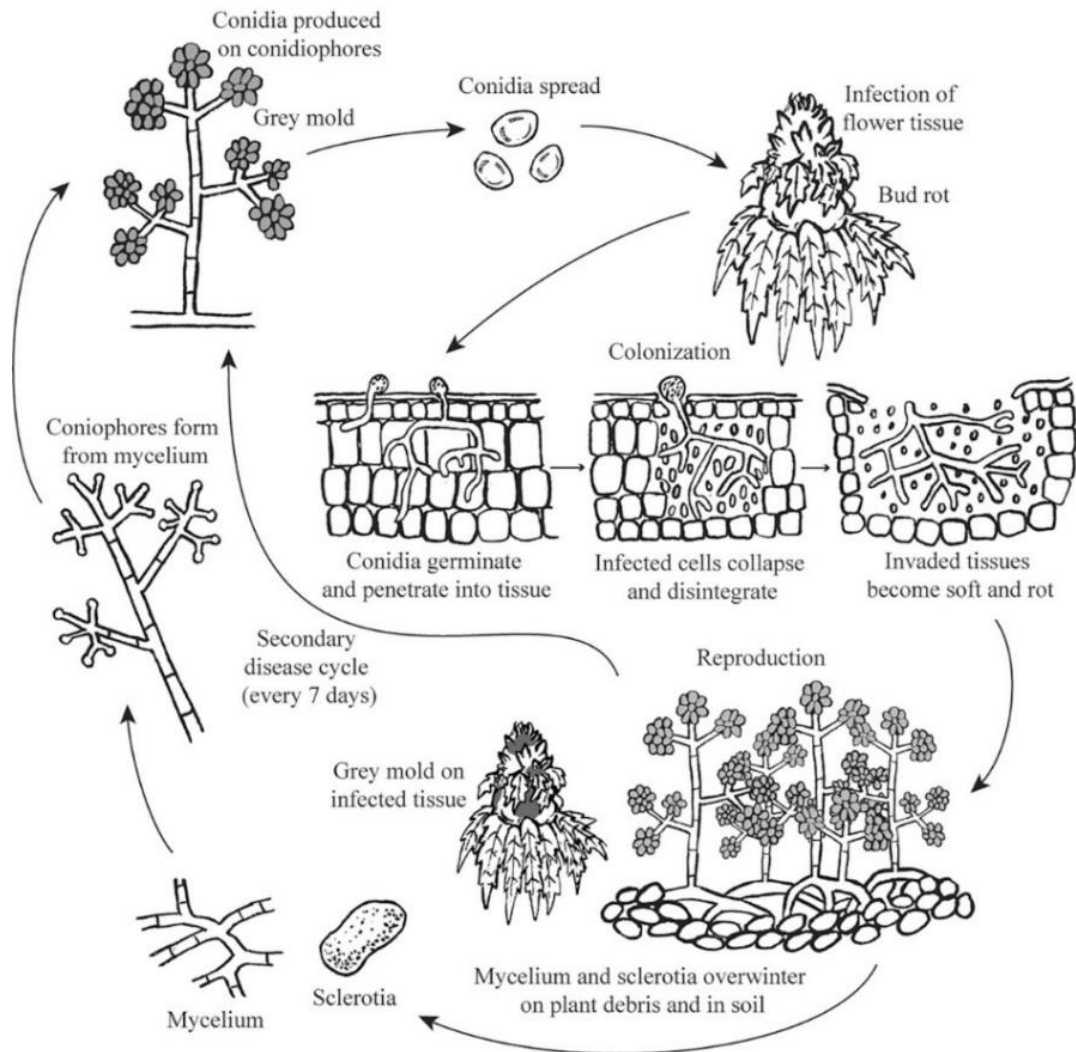


Figura 4 Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*

Fuente: Mahmoud et al., (2023)

1.1.5.2.2. Síntomas de la enfermedad

En las plantas infectadas se puede identificar el tizón por *Botrytis cinerea* cuando el micelio se torna gris y esponjoso. Al iniciar las etapas de cultivo a partir de esquejes vegetativos (enraizamiento) y formación de plántulas, bajo condiciones de humedad relativa alta (HR) y baja temperatura, es considerado como causante del “Damping off” (Figura 5).

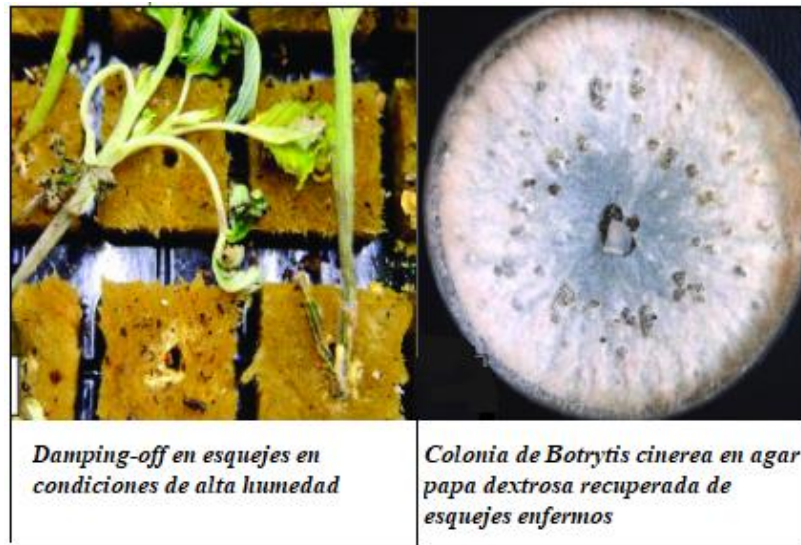


Figura 5 Síntomas de infección de cannabis cultivados en invernadero por Botrytis cinerea.

Fuente: Mahmoud et al., (2023)

En la etapa de floración entre las 7 – 8 semanas las inflorescencias infectadas por *Botrytis cinerea* presentan pudrición del cogollo, como también un rápido deterioro de las hojas de las inflorescencias y pistilos hasta afectar a toda la flor (Figura 6)(Patiño et al., 2022).

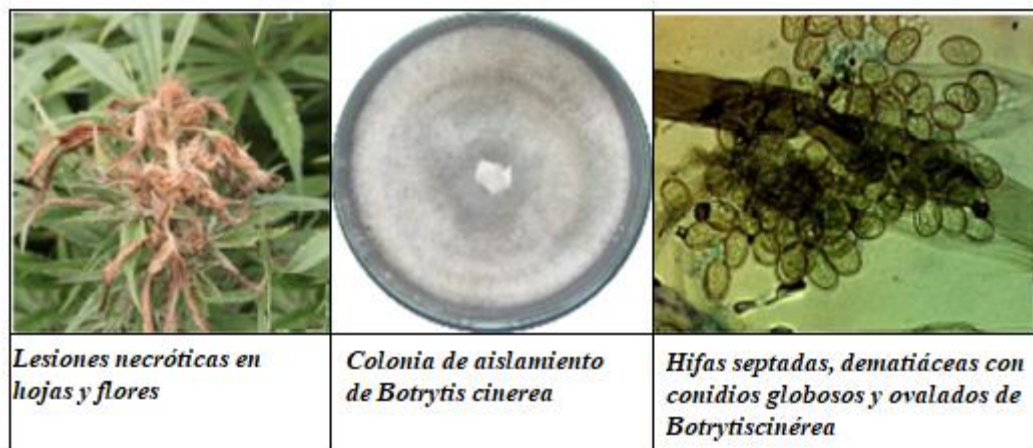


Figura 6 Podredumbre marrón o moho gris causado por Botrytis cinerea.

Fuente: Patiño et al., (2022)

1.1.5.2.3. Signos de la enfermedad

Botrytis cinerea hongo fitopatógeno que al atacar a su hospedero produce gran cantidad de micelio gris y conidióforos largos y ramificados, sus células apicales son redondeadas y producen racimos de conidios unicelulares, de forma ovoide o

esférica, transparente o levemente coloreados semejándose al racimo de las uvas (Figura 6c) (Martínez & Moreno, 2008).

Tiene un crecimiento moderado, dependiendo del medio de cultivo pueden ser de tipo micelal que corresponden a un crecimiento rápido, abundante, algodonosa y color pardo; y de tipo esclerocial o esporulante de crecimiento lento, micelio escaso color blanco al inicio para luego tornar un color pardo con esclerosios de color negro distribuidos irregularmente en el medio (Martínez & Moreno, 2008).

1.1.5.3. Pudrición radicular y de la base del tallo por *Rhizoctonia*

Es un hongo polífago, con diversidad morfológica de la familia Ceratobasidiaceae (Tabla 4) y saprófito, permaneciendo en el suelo en forma de esclerocios afectando a un amplio rango de hospedantes susceptibles, principalmente a plántulas causando el mal almácigo. La infección es más severa en condiciones de humedad relativa alta y a temperaturas por encima de los 19 °C hasta los 30°C, y bajo condiciones de luz continua directa produciendo basidios y en períodos de oscuridad liberando basidiosporas (Gondal *et al.*, 2019).

Tabla 4 Taxonomía de Rhizoctonia (R. solani).

Phyllum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycotina

Orden: Ceratobasidiales

Familia: Ceratobasidiaceae

Género: *Rhizoctonia*

Especie: *R. solani*

Fuente: (Gondal *et al.*, 2019; Pérez, 2018)

1.1.5.3.1. Ciclo de vida

La infección inicia con la germinación de basidiósporas formando apresorios en condiciones de humedad relativa alta penetrando en heridas o aberturas o en la epidermis y cutícula, ocasionado lesiones pequeñas en las partes aéreas de los hospedantes susceptibles (Gondal *et al.*, 2019).

La mayoría de infecciones por *Rhizoctonia* son infecciones por esclerocios o por micelio, los mismos que se adhieren a la superficie del hospedante susceptible, para que las hifas comiencen a crecer en la epidermis, hinchándose y formando clavijas de infección para penetrar la cutícula y las células epidérmicas colapsando estas células. Los exsudados liberados por las células en el crecimiento de las raíces de las plantas son la fuente de nutrientes para el desarrollo del hongo, tal como indica en la figura 7.

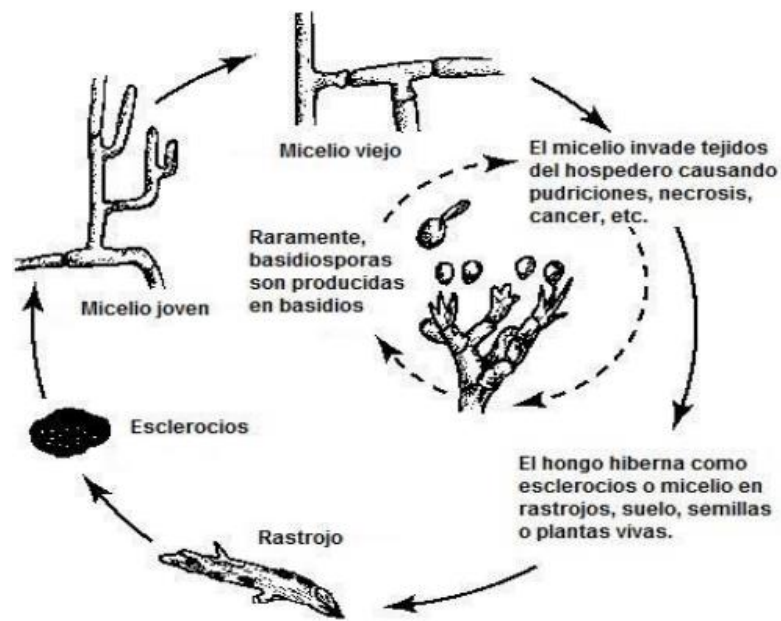


Figura 7 Ciclo de vida de *R. solani*

Fuente: Pérez (2018)

1.1.5.3.2. Síntomas

Rhizoctonia afecta la geminación debido al anillamiento del hipocótilo, plántulas (Damping off) (Figura 8a) y plantas ocasionando pudrición de raíces y de tallo formando áreas ovales, alargadas y hundidas en color marrón rojizo, rodeándolas y debilitándolas causando retraso en el crecimiento de las plantas y en casos graves provocar la muerte (Pérez, 2018).

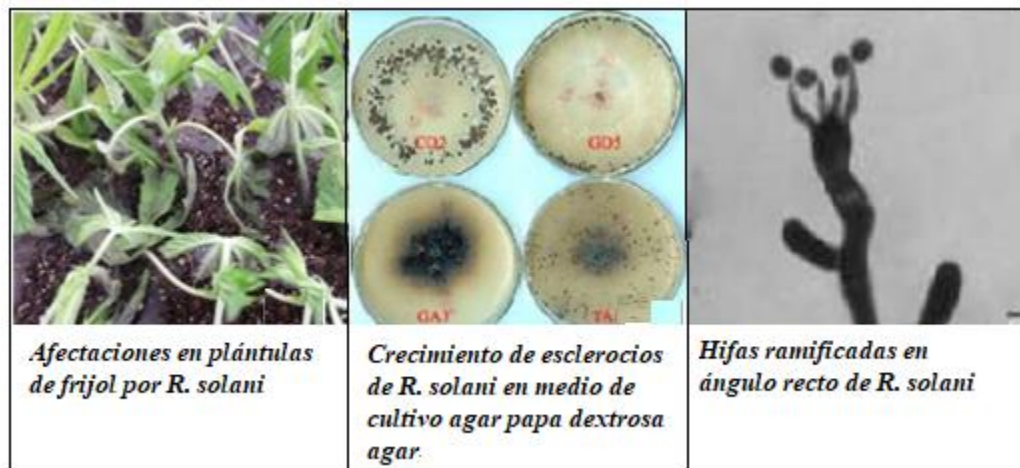


Figura 8 Síntomas y signos por *R. solani*

Fuente: Gondal *et al.*, (2019)

1.1.5.3.3. Signos

Rhizoctonia, se encuentra en la naturaleza como hifas vegetativas (color marrón) y esclerocios (Figura 8b), constituyendo tres tipos de hifas, a) hifas corredoras son rectas y no infecciosas, b) hifas lobuladas son cortas, hinchadas permiten la formación de apresorios, c) hifas especializadas, son células monilioides cortas, anchas participando en la formación de esclerocios (Figura 8c) (Gondal *et al.*, 2019).

1.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus sp. es una bacteria que se ha encontrado en diversos ecosistemas y suelos rizosféricos, a este género se le atribuye múltiples beneficios para las plantas pues producen precursores de fitohormonas, solubilizan fosfatos, tienen una gran capacidad de colonización de raíces y promueven el crecimiento de plantas. Además, estas rizobacterias promotoras del crecimiento, producen metabolitos secundarios con propiedades anti fúngicas por lo que se consideran agentes de biocontrol (Kashyap *et al.*, 2019).

1.2.1. Promotor de crecimiento

Las bacterias promotoras de crecimiento (PGPR), estimulan el crecimiento mediante mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos están relacionados con la 1) fijación biológica del nitrógeno atmosférico por las plantas a través del amoníaco, 2) solubilización de fósforo, mediante sales insolubles de

fosfato, que al ser liberadas pueden ser asimiladas por las plantas, 3) estimulan la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberilinas y ácido abscísico) (Cabello *et al.*, 2019).

Los mecanismos indirectos de las rizobacterias, permiten la asimilación de nutrientes mediante la producción de antibióticos y metabolitos como: 1) producción de sideróforos, 2) producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos (ácido jasmónico, ácido salicílico y fitoalexinas), 3) producción de biopelículas permitiendo disminuir las concentraciones altas de salinidad y sequía en los suelos (Cabello *et al.*, 2019).

1.2.1.1. Mecanismos directos del crecimiento vegetal (PGPR)

1.2.1.1.1. Solubilización de fósforo

El fósforo puede ser solubilizado por algunos microorganismos entre ellos, los géneros *Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus spp.*, entre otros, convirtiéndolos en formas asimilables para las plantas como monobásicos ($\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$) o dibásicos (HPO_4^{3-}), mediante la producción de enzimas (fitasas, fosfomonoesterasa, liasas) y por ácidos orgánicos (glucónico, oxálico, malónico, succínico, cítrico y propiónico) (Cabello *et al.*, 2019).

El principal mecanismo de solubilización del fosfato inorgánico (Ca_2PO_4), son los ácidos orgánicos como el ácido sulfúrico, el ácido nítrico y los ácidos carbónicos actuando directamente en la acidificación, quelación, precipitación y reacciones de óxido reducción en el suelo, disminuyendo el pH para formar complejos estables con Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} (Cabello *et al.*, 2019).

La producción de exopolisacáridos (EPS) y sideróforos son secretados por microorganismos manteniendo una acción indirecta en la solubilización de fosfatos, debido a que los EPS producen en su mayoría microorganismos en situaciones de estrés del ambiente, mediante la unión con metales en el suelo, con el fin de influir en la solubilización de fósforo; Así también, los sideróforos actúan indirectamente en la solubilización de fosfatos de hierro en el suelo debido a su afinidad por la quelación del Fe (Beltrán, 2014).

La mineralización del fosfato provenientes de fuentes orgánicas en los suelos como ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfonatos, ácido fítico, polifosfonatos y fosfatos de azúcar, son mediados por enzimas microbianas como las fosfomonoesterasas, las fitasas, fosfatasa y las liasas C-P (Beltrán, 2014).

Las fitasas y las fosfatasa son producidas por diversos microorganismos entre los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, entre otros. Las fitasas hidrolizan enzimas del ácido fítico o fitatos presentes en plantas, semillas, etc, liberando inositol y moléculas asimilables para las plantas. Las fosfatasa, degradan compuestos como el ADN, proteínas, entre otros, mediante reacciones de desfosforilación liberando fosfato, elemento ideal para ser asimilación por las plantas (González, 2019).

El género *Bacillus* produce fitasas alcalinas con afinidad hidrolítica para remover grupos fosfatos del ácido fítico impidiendo la quelación del fósforo y trazas de elementos presentes en la biomasa radicando importancia en las rizobacterias en brindar soluciones a la baja disponibilidad de fosfato en los suelos (Corrales *et al.*, 2017).

1.2.1.1.2. Fijación de nitrógeno atmosférico

La fijación de nitrógeno es un mecanismo de biofertilización, que puede ser captado del nitrógeno atmosférico correspondiente al 78%, el mismo que es fijado por bacterias, siendo clave para la nutrición de las plantas; a su vez el N₂ puede ser captado mediante la mineralización, proceso bioquímico que es mediado por microorganismos, que inicia de la materia orgánica de las plantas (hojarasca, exudados orgánicos de raíces, necromasa microbiana), los mismos que pueden ser transformados en moléculas inorgánicas de bajo peso molecular, mediante rompimiento de los enlaces y reacciones de oxidación e hidrólisis, en las macromoléculas orgánicas, permitiendo la conversión de nitrógeno orgánico a nitrógeno inorgánico fácilmente asimilable por las plantas (Monsalve *et al.*, 2017).

La fijación de nitrógeno se presenta en dos formas de organismos; a) simbióticos como el género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, entre otros, los mismos que fijan el nitrógeno dentro de los nódulos, secretando moléculas lipo

quito oligosacáridos (Lco) para realizar el proceso mitótico en las raíces, penetrándolas y produciendo el complejo nitrogenasa a bajas concentraciones de oxígeno; y b) organismos a simbióticos como *Aeromonas*, *Serratia* y *Azospirillum* (Espinel *et al.*, 2018).

Según Bonilla *et al.*(2021) los procariotes son los únicos microorganismos que mediante enzimas como la nitrogenasa, permiten la reducción del nitrógeno atmosférico a amoníaco, este proceso es realizado por dos componentes: el componente I, conformado por 2 subunidades de B- proteínas, 24 moléculas de Fe, 2 moléculas de molibdeno (Mo) y cofactores de hierro y molibdeno llamado FeMoCo; el componente II, conformado por alfa proteínas unidas al hierro y un complejo de magnesio y energía (ATP) reduciendo el N₂ hasta NH₃, como se presenta en la siguiente ecuación:



La enzima nitrogenasa realiza reacciones de óxido reducción (oxidorreductasa), fijando el nitrógeno y convirtiéndolo a formas asimilables de absorción por las raíces de las plantas, como amonio (NH₄⁺¹) y nitrato (NO₃⁻¹)(Cerón & Aristizábal, 2012).

1.2.1.1.3. Producción de hormonas y reguladores de crecimiento

Bacillus sp. es capaz de producir ácido 3 indólico acético (IAA), auxina más importante perteneciente a la familia de los indoles, que facilita la iniciación de las raíces mejorando el anclaje de la planta en el suelo, la división celular, diferenciación del tejido vascular, dominancia apical y el desarrollo de los órganos de la planta (Bonilla *et al.*, 2021).

El triptófano (Trp) es el principal precursor de la biosíntesis de ácido indol acético (AIA), mediante cuatro vías de biosíntesis dependientes de Trp, a) vía indol-3 – piruvato (IPA) que en una primera etapa el triptófano se convierte a indol 3-piruvato (IPA) por una aminotransferasa y en una segunda etapa el IPA se descarboxila a ácido indol 3 acetaldehído (AIAI d) para formar AIA, b) vía indol-3. Acetaldoxima (IAOX), el triptófano se convierte a (IAOX) por una oxidorreductasa y en una segunda etapa se convierte por indol acetaldoxima deshidratasa a indol 3-

acetonitrilo (IAN), c) indol 3- acetamida (IAM), el triptófano por oxigenación (monooxigenasa) forma IAM que codificada por el gen *iaaM* se convierte en ácido indol acético, d) Por descarboxilación del triptófano forma triptamina (TPM), que a partir de una amino oxidasa forma indol 3- acetaldehído (IAAM), que finalmente por una deshidrogenasa es convertido a ácido indol acético (AIA) (Diaz, 2018).

1.2.1.2. Mecanismos indirectos del crecimiento vegetal (PGPR)

1.2.1.2.1. Producción de antibióticos

La producción de antibióticos, es un mecanismo que poseen diferentes géneros de PGPR entre ellos se encuentran las *Pseudomonas* (familias de fenazinas, pirrolnitrinas, pioluteorina, floroglucinoles, lipopéptidos cíclicos y cianuro de hidrógeno), *Bacillus* y *Streptomyces* (Bonilla *et al.*, 2021).

Los antibióticos volátiles como 2, 3 -butanodiol, los lipopéptidos (surfactinas, iturinas y fengicinas) y el cianuro de hidrógeno (HCN), son antibióticos producidos por el género *Bacillus*. Según Yáñez & Falconí (2018) examinaron dos cepas de *Bacillus* y detectaron la presencia de genes de lipopéptidos (fengicina, iturrina y surfactina). Al evaluar el efecto antifúngico de *Bacillus* se determinó que del 76,2% al 100 de las células vivas y del 68,2% al 96,1% del sobrenadante presentaron actividad antifúngica.

Por tanto, se ha demostrado que *B. subtilis* inhibe el crecimiento de micelio de hongos patógenos en poscosecha y cultivados *in vitro*, esto gracias a precipitados blancos alrededor de las colonias bacterianas que se extienden al interior de la zona de inhibición del micelio del patógeno, al igual que los sobrenadantes libres de células de *B. subtilis* que inhibieron el crecimiento fúngico en un 89-100% en todos los patógenos estudiados (Yáñez, 2012).

1.2.1.2.2. Producción de sideróforos

Son considerados antibióticos o genes de defensa, uniéndose al hierro con alta afinidad para evitar el crecimiento de patógenos o aumentar la disponibilidad del hierro. Los sideróforos son compuestos quelantes que captan el ion férrico (Fe^{+3}) del suelo solubilizándolo para hacerlo disponible para la planta, consecuentemente

permitiendo la reducción en la proliferación de patógenos debido a la competencia de nutrientes (Bonilla *et al.*, 2021).

1.2.1.2.3. Enzimas líticas

Las bacterias promotoras de crecimiento tienen la capacidad de degradar las paredes de los patógenos (*Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, entre otros), mediante la producción de enzimas líticas como las glucanasas, quinasa y celulasas, a pesar de que algunas plantas son capaces de producir estas enzimas (patogénesis), los microorganismos bio controlan algunos patógenos de las plantas (Camelo *et al.*, 2011).

1.2.1.2.4. Inducción a la resistencia sistémica

Al ser un PGPR, *Bacillus*, ayuda a la regulación de mecanismos de defensa sin necesidad de mantener contacto directo con el patógeno, esto se debe a que esta bacteria mejora las proteínas y enzimas destinadas al control y defensa de las plantas contra patógenos a través de la relación de *Bacillus* con las bacterias de ISR en una parte específica de la planta, que se extiende progresivamente a todo el sistema. Para la activación de esta resistencia es necesario que se efectúe el ataque del patógeno y con esto lograr cambios metabólicos que desemboquen en la expresión de genes de defensa (Kashyap *et al.*, 2019).

La expresión de genes de defensa implica la producción de lipopéptidos dentro de los tejidos vegetales, mismos que pueden aumentar la concentración de moléculas de ácido salicílico. Según Yáñez & Falconí (2021) las actividades de enzimas asociadas al sistema de defensa como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasa fueron mayores en raíces y brotes de las plantas que crecieron de las semillas sometidas a tratamiento con *Bacillus* a comparación de las plantas que crecieron de las semillas del tratamiento control.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del lugar de investigación

2.1.1. Ubicación Política

El laboratorio e invernadero donde se realizaron los ensayos está ubicado en la hacienda El Prado situada en el Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando. (Latitud 00° 23' 20" S, Longitud: 78° 24' 44" O) Corresponde a la formación vegetal bosque muy húmedo montano según Sierra (1999).



Figura 9 Ubicación laboratorio de Fitopatología y Control Biológico del IASA

Fuente: Google Earth (2023)

2.2. Materiales, Insumos y Equipos

Durante la investigación se emplearon, recipientes, alambre, fundas ziploc rótulos, cintas, adicional a ello, en el laboratorio: tubos de ensayo, mechero eléctrico, hematocito metro, cajas Petri, porta y cubre objetos, vasos de precipitación, asa de platino, atomizadores, gradilla, micropipeta, frascos tarados, matraz Erlenmeyer, probetas, gradillas, espátula, mechero de alcohol, cloro al 5%, alcohol 98%, acetona 80%, seis rizotrones (1.0 m de largo x 0,5 m de ancho x 0,5 m de profundidad), papel filtro, sustrato inerte, cascarilla, tierra estéril, pomina en relación (1:1:1).

Entre los equipos se utilizó balanza de precisión, refrigeradora, microscopio óptico, cámara de flujo laminar, incubadora, esterilizador, centrifugadora, espectrofotómetro cámara fotográfica y bomba de fumigación fluorómetro, medidor de clorofila (OPTI-SCIENCES CCM-200 plus), adicional a ello, se utilizó una libreta de campo, implementos de oficina y programas informáticos como, WORD®, EXCEL®, INFOSTAT®.

2.2.1. Reactivos

Para la detección y cuantificación de auxinas se llevó a cabo empleando el reactivo de Salkowski (1 ml de FeCl_3 0.5M, 49 ml de agua y 50 ml de ácido perclórico).

2.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo a utilizar fueron los siguientes:

Medio Ashby manitol (Manitol 5g/L, Fosfato di potásico 0.2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, NaCl 0.2g/L, Sulfato de calcio 0.1g/L, Carbonato de calcio 0.1g/L, Agar 17.0 gL⁻¹, pH final 7.2) para conocer si son o no fijadores libres de nitrógeno.

Medio Pikovskaya (Extracto de levadura 0.5 gL⁻¹, Dextrosa 10 gL⁻¹, CaPO_4 5 gL⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 gL⁻¹, KCl 0.2 gL⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 gL⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0001 gL⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0001 gL⁻¹, Agar 15 gL⁻¹) para identificar la disolución de fosfatos.

2.2.3. Biológicos

Los materiales biológicos utilizados fueron: cepas de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 de formulación comercial (BaciFORM) y semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*), adicional a ello, también se incluirá *Rhizobium sp*, como control microbiano positivo en las pruebas *in vitro*.

2.3. Instalación del cultivo

Se evaluó la respuesta de 24 plantas de cáñamo por efecto de células de dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en condiciones de invernadero.

Se colocaron cuatro plantas de cáñamo en rizotrones con dimensiones (1.0 m x 0,5 m x 0,4 m), cada dos plantas será una unidad experimental. Sobre las unidades experimentales se distribuyeron en forma aleatoria los tratamientos descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Características
T1	Ocho semillas de cáñamo inoculadas con células libres de <i>B. subtilis</i> cepa comercial CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml)
T2	Ocho semillas de cáñamo inoculadas con células libres de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 cepa comercial (1×10^6 UFC/ml)
T3 (Testigo)	Ocho semillas de cáñamo sumergidas en agua destilada estéril

El experimento se dispuso bajo un diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos y 4 repeticiones. La disposición del experimento se realizó bajo invernadero como indica la figura 2.

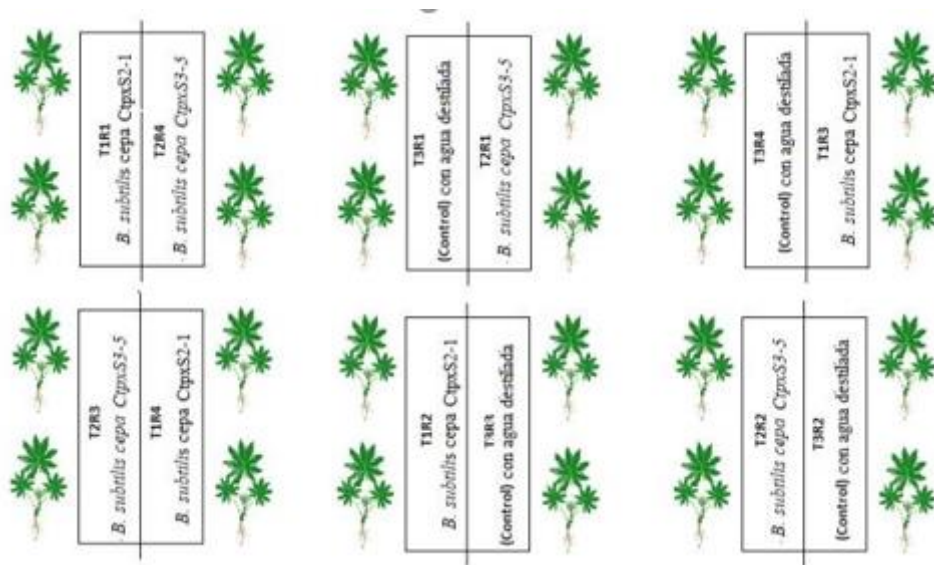


Figura 10 Diseño experimental del ensayo en invernadero

Fuente: Autoría propia

2.4. Métodos

2.4.1. Fase de invernadero

2.4.1.1. Inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en semillas de cañamo

Semillas de cañamo, se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, por dos minutos, luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril, y posterior a ello, se sumergieron en alcohol al 70% por dos minutos más, se enjuagaron en agua destilada, para su posterior inoculación con *B. subtilis* comercial (cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5), a una concentración de 1×10^6 UFC ml^{-1} (semillas sumergidas en inóculo por 4 horas), para posteriormente colocarlas en la cámara de germinación durante siete días aproximadamente a 22°C .

2.4.1.2. Establecimiento de plántulas de cañamo en invernadero

En el invernadero cuarentenario del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Universidad de Fuerzas Armadas – ESPE carrera de Ciencias Agropecuarias IASA, se instalaron 6 rizotrones (1,0 m de largo, 0,5 m de ancho y 0,5 m de profundidad), con sustrato estéril.

Se colocaron 4 plántulas previamente germinadas en cada rizotrón, según el diseño de instalación (DCA), y lo más próximo al vidrio, facilitando la observación de las raíces.



Figura 11 Establecimiento de plántulas de cáñamo en invernadero

Fuente: Autoría propia

2.4.1.3. Inoculación de *Bacillus subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 en plántulas de cáñamo

Cepas comerciales de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, en concentración de 1×10^6 UFC ml^{-1} , se inocularon en las plántulas de cáñamo cada 15 días, durante 3 meses, se aplicó 200 ml a la altura de la base del cuello del tallo por cada planta, además, se tomó una muestra de suelo a nivel de la rizósfera, para realizar la dinámica poblacional (fase de laboratorio) antes de cada aplicación.

2.4.2. Variables a evaluar

2.4.2.1. Fase de invernadero

Para evaluar el efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento, se consideró a nivel de invernadero los siguientes parámetros agronómicos.

2.4.2.1.1. Altura de la planta

La altura de la planta se midió con cinta métrica, desde la base del cuello hasta la parte más alta del ápice durante 3 meses cada 15 días por cada unidad experimental.

2.4.2.1.2. Índice de contenido de clorofila

El Índice de Contenido de Clorofila (ICC), se obtuvo en condiciones de invernadero, en hojas cercanas al ápice, con ayuda del fluorómetro Opti-Sciences CCM-200 el cual permite una estimación de clorofila no destructiva.

2.4.2.2. Fase de laboratorio

2.4.2.2.1. Pruebas duales de antagonismo

Las pruebas duales para evaluar el efecto inhibitor de las cepas del producto comercial Ctpx S2-1, Ctpx S3-5 sobre *Fusarium spp.* se realizaron *in vitro* en una concentración de 1×10^6 UFC ml^{-1} .

En cajas Petri con medio PDA se colocó una rodaja de 5 mm de diámetro de micelio del hongo activo a 25 ° C por 7 días en PDA (caja Petri control).

Partiendo desde el centro hacia afuera de la caja a tres cm de distancia con un sacabocados de 0,05 mm se hicieron unos pocillos donde se colocó 15 μl de cada uno de los tratamientos y se incubaron durante 7 días a 25 °C.

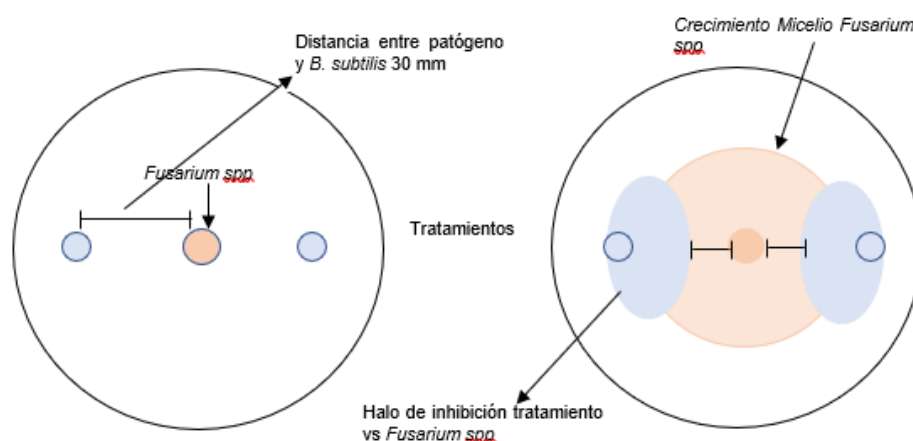


Figura 12 Esquema utilizado en pruebas duales *in vitro*

Nota. Simbología: En el centro rodaja de agar con micelio fúngico, en los lados alícuotas de 15 μl de células libres 1×10^6 UFC ml^{-1} , depositados a 3 cm del centro e incubado a 25 °C por 7 días.

Los datos obtenidos fueron considerados y comparados por medición de los diámetros del halo de inhibición en cajas Petri tratadas con el tamaño del diámetro de la colonia de la caja Petri control a los 7 días post tratamiento.

2.4.2.2.2. Pruebas bioquímicas

La fijación de nitrógeno se determinó mediante siembra por agotamiento de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 y la bacteria control en placas con medio Ashby, medio sólido libre de nitrógeno (Manitol 20.0 g/l, K₂ HPO₂ 0.2 g/l, MgSO₄·7h₂O 0.2 g/l, NaCl 0.2 g/l, KSO₂ 0.1 g/l, CaCO₃ 5.0 g/l, y agar 17.0 g/l).

La actividad disolvente de fosfatos se determinó incubando 10 µl de cada inóculo en concentración de 1x10⁶ cel. ml⁻¹ en medio Pikovskaya, evidenciando un halo transparente alrededor de las colonias considerando una prueba positiva para la solubilización de fosfatos (Romero et al., 2019).

2.4.2.2.3. Cuantificación de proteína

Para conocer el efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento por incremento de la biomasa, se cuantificó el contenido de proteína, para ello se utilizó Quanti pro™ BCA Kit SIGMA-ALDRICH®, la solución madre, la solución buffer y la solución de reacción para el análisis se realizó de forma estricta como lo indica el protocolo del Kit.

A partir de la colecta de hojas de cáñamo por tratamiento y repetición, se procedió a preparar la solución madre, las hojas frescas fueron colocadas en tubos Falcon para posteriormente introducir las en el nitrógeno líquido, hasta que la hoja esté pulverizada, se pesó 1 g de hojas liofilizadas y se colocó en tubos Eppendorf con 1 ml de PBS, se maceró con un micropistilo y se aforó a 2 ml con PBS, conservando la cadena de frío, se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 1400 RPM y se extrajo 500 µl del sobrenadante con 100 µl de PBS en relación 1:2, en nuevos tubos Eppendorf, para centrifugar nuevamente, para culminar el proceso se colocaron los tubos en la crio congeladora a 80 °C.

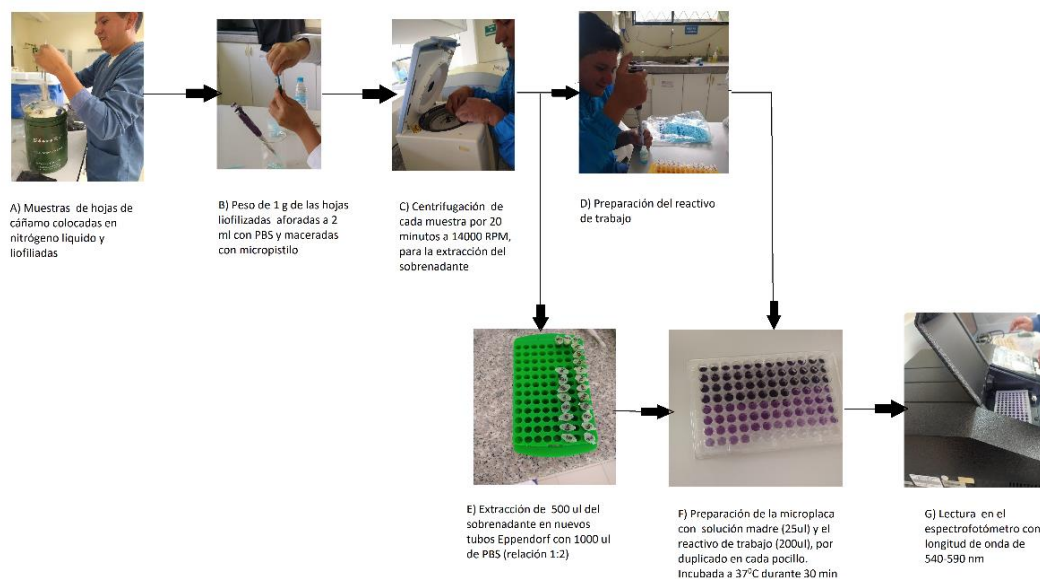


Figura 13 Cuantificación de proteína en hojas frescas de cañamo

Fuente: Autoría propia

Para la preparación del reactivo de trabajo (WR) se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\# \text{ de muestras}) \times (\# \text{ réplicas}) \times (0,2 \text{ ml volumen de RT por muestra}) = WR$$

Se preparó el reactivo de trabajo, mediante la mezcla de 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B, es decir, 9804 ul del reactivo A y 196 ul partes del reactivo B, para 25 muestras con dos réplicas.

Por último, para la preparación de la microplaca, se colocó 25 ul de la solución madre previamente preparada por duplicado en cada pocillo y 200 ul del reactivo de trabajo, se tapó la microplaca y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Terminado el tiempo se procedió a colocar en el espectrofotómetro ajustando a una longitud de onda de 540 -590 nm para obtener la medición y obtener la curva de calibración (Tabla 6).

Tabla 6. Curva estándar para la determinación de proteína por espectrofotometría

Estándares	Volumen de PBS (µL)	Volumen de BSA (µL)	Concentración de BSA final (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 de la dilución del tubo B	750
E	325	325 de la dilución del tubo C	500
F	325	325 de la dilución del tubo E	250
G	325	325 de la dilución del tubo F	125
H	400	100 de la dilución del tubo G	25
I	400	0	0 = Blanco

Fuente: Thermo Scientific (2007)

2.4.2.2.4. Medición cuantitativa de Ácido Indol Acético (AIA)

La producción de AIA, se determinó en base a los protocolos de Salkowski, 1889 y modificado por Bric *et al.*, 1991, para ello, se preparó una solución madre de 1 mg/ml de ácido indol acético (AIA) para realizar soluciones patrón con concentraciones de 0, 2, 4, 8, 10, 15, 20 y 30 µg/ml, se construyó una curva de calibración de ácido indol acético (AIA) (Tabla 7) y se midió la absorbancia a 530 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS con coeficiente de correlación aceptable de las auxinas de R₂ de 0,99 a 1 (Diaz, 2018).

Tabla 7. Estándares para la curva de calibración de AIA

Solución madre		Curva estándar	
volumen solución madre (ul)	Volumen de agua (ul)	AIA (ug/ml)	lecturas de absorbancia
0	0	0	0
5	995	5	0,091
10	990	10	0,179
15	985	15	0,275
20	980	20	0,359
25	975	25	0,435
30	970	30	0,518

Nota. La columna volumen solución madre (ul) indica el volumen que se tomó para realizar diluciones y llegar a las concentraciones requeridas para construir la curva estándar de AIA; la columna volumen de agua (ul) indica el volumen de agua destilada para construir la solución madre; la columna AIA (ug/ml) indicará la concentración esperada de AIA

Fuente: (Intriago, 2021)



Figura 14 Cuantificación de ácido indol acético (AIA) en muestras de raíces de cáñamo

Fuente: Autoría propia

Para el análisis en planta de ácido indol acético (AIA), se tomaron muestras de raíz por tratamiento evitando la exposición a la luz, se colocaron en tubos de ensayo con acetona al 80% y se dejó reposar a -4°C durante 5 días para evitar la degradación del AIA. A continuación, se pesó un gramo de raíz, se maceró finamente y se filtró, recolectando la muestra en otros tubos de ensayo, para añadir posteriormente 2,5 a 3 ml de reactivo de Salkowski (1ml de cloruro férrico 0,5mol/l y 50 ml de ácido perclórico al 35%, se agitó y se llevó a baño maría a 60 °C durante 5 min). Los tubos de ensayo fueron envueltos con papel aluminio, se centrifugó a 500 RPM por cinco minutos, y fueron llevados al espectrofotómetro para evaluar (AIA), por cada tratamiento cada 15 días antes de cada inoculación (Figura 14) (Intriago, 2021).

2.4.2.2.5. Contenido de clorofila

Para la Cuantificación del contenido de clorofila se colectaron hojas frescas de *L. mutabilis* y se procedió a cortarlas en finas tiras hasta pesar 0,5 g de cada muestra por tratamiento y repetición para posteriormente colocarlas en tubos de ensayo forrados de papel aluminio para evitar el contacto de luz y rotulados, con 5 ml de cetona macerado para cada muestra, se procedió a macerar con una varilla de vidrio, se tapó cada tubo para llevar a refrigeración (-4°C) por 24 horas. A continuación, se colocó cada muestra en Tubos Falcon para centrifugarlos a 2000 RPM durante 10 minutos, se extrajo 1 ml del sobrenadante y se aforó cada muestra hasta 6 ml con cetona. Se extrajo 1500 ul de las muestras en celdas para medir en el espectrofotómetro ajustando a 645 y 663 nm como indica la figura 15.

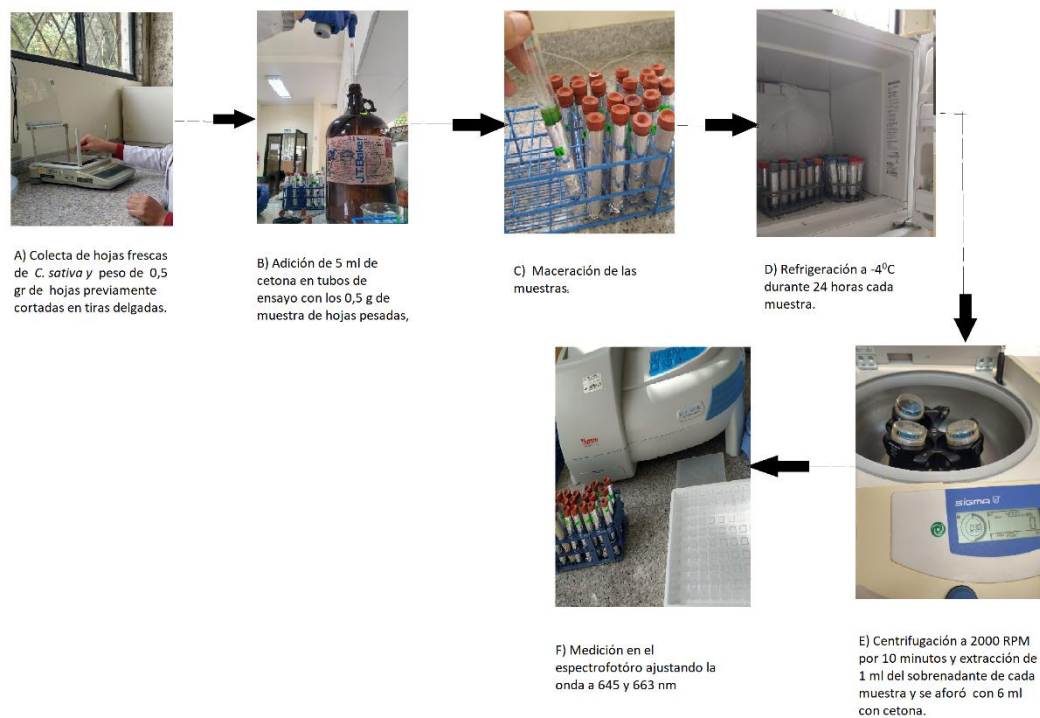


Figura 15 Determinación del índice clorofila en hojas frescas de *C. sativa*

Fuente: Autoría propia

2.4.2.2.6. Sólidos solubles totales

A partir de la colecta de hojas de cáñamo por tratamiento y repetición, se procedió a preparar la solución madre, las hojas frescas fueron colocadas en tubos Falcon para posteriormente introducirlas en el nitrógeno líquido, hasta que la hoja esté pulverizada, se pesó 1 g de hojas liofilizadas y se colocó en tubos Eppendorf con 1

ml de PBS, se maceró con un micropistilo y se aforó a 2 ml con PBS, conservando la cadena de frío, se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 1400 RPM y se extrajo 500 ul del sobrenadante con 100 ul de PBS en relación 1:2, en nuevos tubos Eppendorf, para centrifugar nuevamente, y posteriormente se colocaron los tubos en la crio congeladora a 80 °C.

A las 24 horas se pesaron nuevos tubos Eppendorf para obtener el peso inicial (Po), posteriormente se colocó 100 ul de las muestras dejadas previamente en la crio congeladora, se colocaron en la estufa en un recipiente vidrio sellado con sílica gel en su base para absorción de la humedad del medio, pasado el tiempo de 24 horas se procedió a obtener el peso final (Pf) de las muestras (Figura 16).

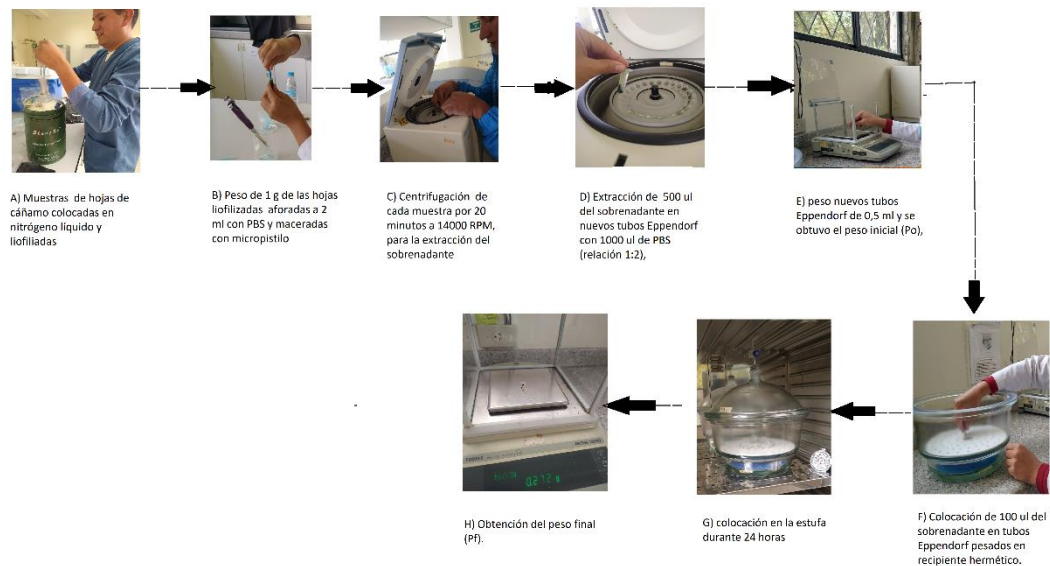


Figura 16 Sólidos solubles totales (SST) de hojas frescas de *C. sativa*

Fuente: Autoría propia

2.4.2.2.7. Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

Para evaluar la dinámica poblacional, se obtuvieron muestras suelo de la rizósfera inoculada, que se sometieron a una temperatura de 80° C para eliminar microorganismos que no están en estudio puesto que una de las propiedades de *B. subtilis*, es encapsularse y permanecer latente hasta encontrar condiciones apropiadas (Yáñez, 2012).



Figura 17 Dinámica poblacional de la rizósfera inoculada con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

Fuente: Autoría propia

Posterior a ello, se tomaron 10 g de suelo, por tratamiento y repetición, se colocó 90 ml de PBS para evaluar la supervivencia de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, en la rizósfera de la planta de cáñamo mediante el método de dilución y plating (Figura 17), el porcentaje de la población viable, se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$UFC\ g^{-1} = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrados en ml}}$$

2.4.3. Factores en estudio

Factor A: Plantas de cáñamo

Factor B: Microorganismos

- *B. subtilis* CtpxS2-1
- *B. subtilis* CtpxS3-5
- Control positivo (Ck) *Rhizobium* spp.

2.4.4. Codificación de tratamientos

Tabla 8 Codificación de los tratamientos.

Tratamiento	Codificación	Factor A	Factor B
T1	I1C1	Plantas de cáñamo	<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5
T2	I1C2	Plantas de cáñamo	<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1
T3	I1C3	Plantas de cáñamo	Agua CK

Fuente: Autoría propia

2.5. Análisis estadístico

Se empleó el modelo matemático del análisis de varianza (ADEVA), presentado en el siguiente esquema:

Tabla 9. Diseño del esquema del ADEVA

Fuentes De Variación	gl
Tratamientos	2
Error	9
Total	11

Fuente: Autoría propia

Las variables se analizaron mediante estadística descriptiva (media, desviación estándar y coeficiente de variación), se realizaron análisis de varianza ANOVA y pruebas de comparación de Tukey al 5%, con un diseño completamente al azar (DCA), mediante el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + A + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

A= Efecto de la i-ésima aplicación

e_{ij} = Error experimental

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.1. Fase de invernadero

Para evaluar el efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento, se consideró a nivel de invernadero los siguientes parámetros agronómicos.

3.1.1.1. Altura de la planta

Las medias de la altura de plantas de cáñamo tratadas con inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml) y testigo (agua), tomadas cada quince días, no presentaron diferencias significativas.

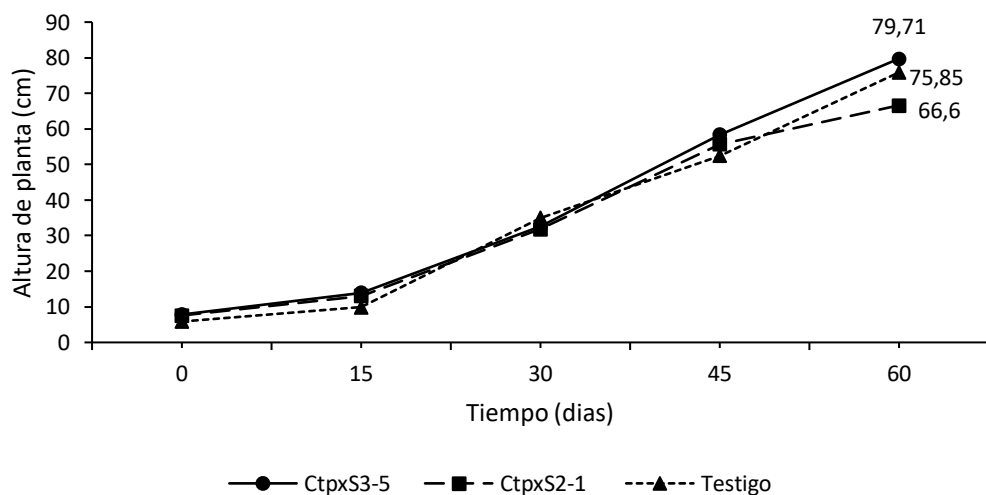


Figura 18 Altura de las plantas de cáñamo (cm) durante tres meses de aplicación

Fuente: Autoría propia

Sin embargo, para evaluar el efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento la cepa CtpxS3-5 obtuvo mayor altura de 79,71 cm a los sesenta días de evaluación a comparación del tratamiento testigo de 75,85 cm (Figura 18).

Datos que coinciden con Ruiz *et al.*, (2020) que al evaluar la promoción de crecimiento y calidad de frutos de tomate (*Solanum lycopersicon*) usaron tres cepas de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* y *B. subtilis subsp. Inaquosorum*) obteniendo mayor longitud de raíz (45cm) y altura (1.45 cm) a comparación del tratamiento testigo, causando efecto positivo notable en las variables de respuesta a comparación del tratamiento testigo

3.1.1.2. Índice de contenido de clorofila

Con relación al Índice de Contenido de Clorofila (ICC), obtenidos con el fluorómetro Opti-Sciences CCM-200 en hojas cercanas al ápice de las plantas de cáñamo tomadas cada 15 días durante la fase experimental, presentaron diferencias significativas, para cada tratamiento y repetición ($F_{4,25} = 4,91$; $P < 0,0178$) (Tabla 10).

Tabla 10. Promedio \pm desviación estándar de Unidades de CCI de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1, Ctpx3-5 y testigo en hojas de cáñamo

Tratamiento	Unidades de CCI	
Ctpx2-1	32,07 \pm 6,10	A
Ctpx3-5	24,2 \pm 5,85	B
Testigo	23,94 \pm 5,73	B

Nota. Medias en la misma columna con letra diferente difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha > 0,05$).

De acuerdo a lo indicado, la cepa CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentaron mayor contenido de clorofila con 32,07 unidades de CCI y 24,2 unidades de CCI respectivamente a comparación del testigo con 23,94 unidades de CCI.

Lo que concuerda con Castañeda *et al.* (2018) mediante la estimación de la concentración de pigmentos fotosintéticos relacionados a la concentración de nitrógeno utilizando métodos no destructivos en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.)

con dos dispositivos SPAD 502 y CCM200 presentando correlaciones altas de $R^2=0,9343$ y mayor distribución de clorofila en el tercio medio de la planta.

3.1.2. Fase de laboratorio

3.1.2.1. Evaluación antagonista de *B. subtilis* Ctpx S2-1, Ctpx S3-5 en el control sobre crecimiento de *Fusarium spp*.

La efectividad de *B. subtilis* en el control del crecimiento de *fusarium spp* mediante pruebas duales con tratamientos de células libres, las dosis para células libres fueron de 1×10^6 UFC ml^{-1} .

El efecto inhibitorio de las dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1, CtpxS3-5 mitigaron ($p < 0,0001$) el crecimiento *in vitro* de *Fusarium spp* (Tabla 11).

Tabla 11 Crecimiento de *Fusarium spp* en pruebas duales *in vitro* IASA, 2023

<i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium spp</i>
CtpxS3-5 a	16,07
CtpxS2-1 a	17,56
Testigo b*	33,29

Nota. ^{a, b} medias de inhibición del crecimiento de la colonia de *Fusarium spp* en medio PDA a 25 grados centígrado durante 7 días en incubadora. * Colonia de *Fusarium spp* en medio PDA a 25 grados centígrados durante 7 días en incubadora incluido como referencia.



Figura 19 Colonia de *Fusarium spp* en medio PDA a 25 grados centígrados durante 7 días en incubadora

Fuente: Autoría propia

El promedio general para el mayor diámetro de la colonia de *Fusarium spp.* fue: 33,29 mm y el menor diámetro fue 16.07 mm, Si bien en los aislamientos CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no se encuentran diferencias estadísticas se observa que el menor diámetro de la colonia de *Fusarium spp* corresponde al aislado CtpxS3-5 siendo este el más eficiente con respecto al testigo.

3.1.2.2. Pruebas bioquímicas

Los resultados obtenidos de la fijación de nitrógeno a partir de siembra por agotamiento de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 (Figura 20a) y CtpxS3-5 (Figura 20b), y de las colonias obtenidas del sustrato inoculado por tratamiento y repetición evidenciaron crecimiento de la bacteria en medio Ashby (medio libre de nitrógeno); al igual se puede verificar que la bacteria control (*Pseudomona spp.*) (Figura 20f) y tratamiento testigo (Figura 20c) no presentaron crecimiento, realizando diluciones sucesivas hasta la 10^{-3} sembradas en placas con medio Ashby.

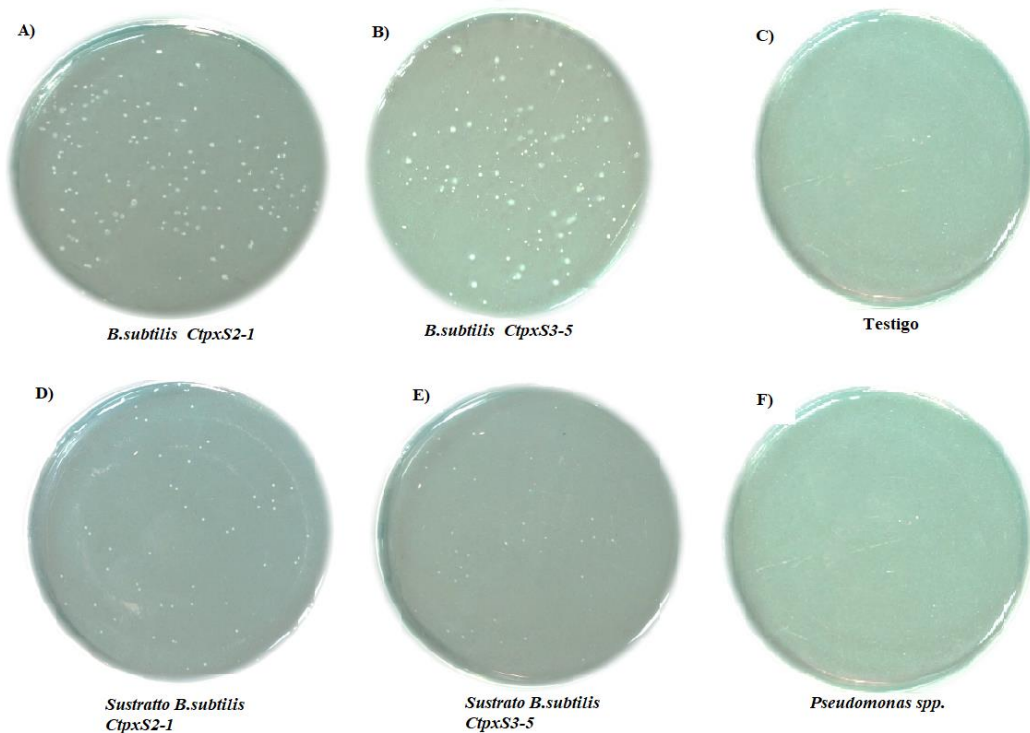


Figura 20 Inoculaciones en medio Ashby Manitol de *B. subtilis* (1×10^3 UFC/ml)

Fuente: Autoría propia

Los resultados obtenidos en el cultivo de cáñamo coinciden con los obtenidos por Serrano *et al.*, (2022) en plantas de ají (*Capsicum sp.*), mediante cepas de *B. subtilis* cultivadas en medio Ashby dando positivas la concentración de nitrógeno.

Con respecto a la actividad solubilizadora de fosfatos en medio Pikovskaya, a partir de las colonias de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 (Figura 21a, c) y del sustrato inoculado con las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5 (Figura 210b, d) mediante diluciones sucesivas (hasta 10^{-3} UFC/ml) se obtuvieron un halo de crecimiento alrededor de las colonias a comparación del tratamiento testigo (Figura 21e) sin presentar viraje de color alrededor de las colonias de bacterias.

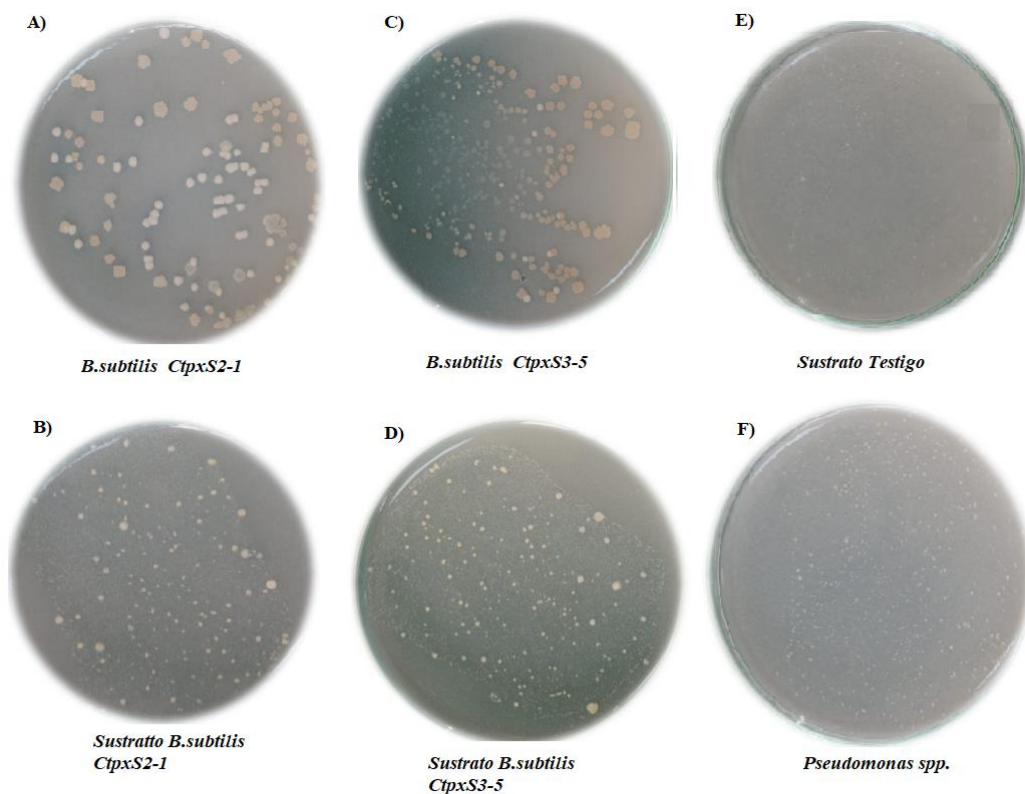


Figura 21 Inoculaciones en medio Pikovskaya de *B. subtilis* (1×10^3 UFC/ml)

Fuente: Autoría propia

Lo que concuerda con el estudio de Corrales *et al.* (2014) presentando formación de halos de solubilización en medio Pikovskaya de 11 cepas del género *Bacillus* a las 24 horas de incubación y 48 horas de incubación entre las cuales las cepas de *B. brevis* y *B. pumilus* presentaron mejores resultados constituyéndose cepas

prometedoras y eficientes para realizar el proceso de solubilización de fósforo a comparación de los controles *Bacillus sphaericus* nativo y *B. sphaericus* por lo tanto no presentaron halo de solubilización.

3.1.2.3. Cuantificación de proteína

Con relación a la cuantificación de proteína utilizando hojas frescas de cáñamo por tratamiento y repetición, no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se obtuvo promedios mayores en el contenido de protéico en el tratamiento inoculado con *B. subtilis* CtpxS3-5 de 5,07 mg de proteína extraída/g de material fresco a comparación del tratamiento testigo con 4,74 mg/g (Figura 22).

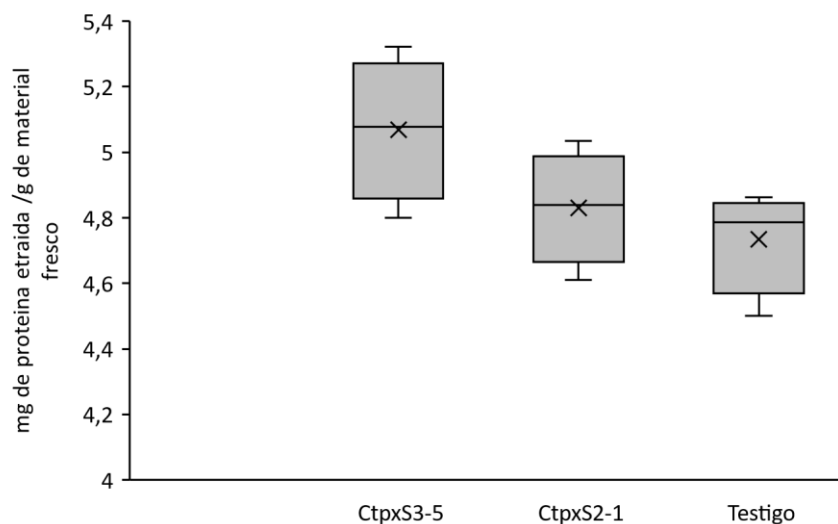


Figura 22 Efecto de B. subtilis en el contenido protéico (mg/g) en hojas frescas de C. sativa al final de la fase experimental

Fuente: Autoría propia

Resultados obtenidos según Alamilla *et al.*, (2020) no coinciden realizado en plantas de acelga (*Beta vulgaris* var. *Cycla*), donde no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, el tratamiento con *B. subtilis* presentó menor concentración de proteína (10,53 mg/ml \pm 1,69) a comparación de tratamiento con vermicomposta (13,20 mg/ml \pm 4,248).

3.1.2.4. Medición cuantitativa de Ácido Indol Acético (AIA)

Con respecto a la producción de AIA, se determinó en base a los protocolos de Salkowski por espectrofotometría, las plantas de cáñamo inoculadas con *B. subtilis*

Ctpx3-5 y Ctpx2-1, presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{4,25}=8,43$, $p<0,0086$) como indica la tabla 12.

Tabla 12 Promedio \pm desviación estándar de AIA (mg/ml) en raíces de cáñamo al final de la fase experimental.

Tratamiento	AIA (mg/ml)	
Ctpx2-1	1,32 \pm 0,17	A
Ctpx3-5	1,16 \pm 0,08	A B
Testigo	0,88 \pm 0,18	B

Nota. Medias en la misma columna con letra diferente difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha > 0,05$).

Se evidenció mayor concentración de AIA de 1,32 mg/ml y 1,16 mg/ml en las raíces de las plantas de cáñamo tratadas con *B. subtilis* Ctpx2-1 y *B. subtilis* de la cepa Ctpx3-5 respectivamente, a comparación del testigo con una concentración de 0,88 mg/ml de auxina (Figura 23).

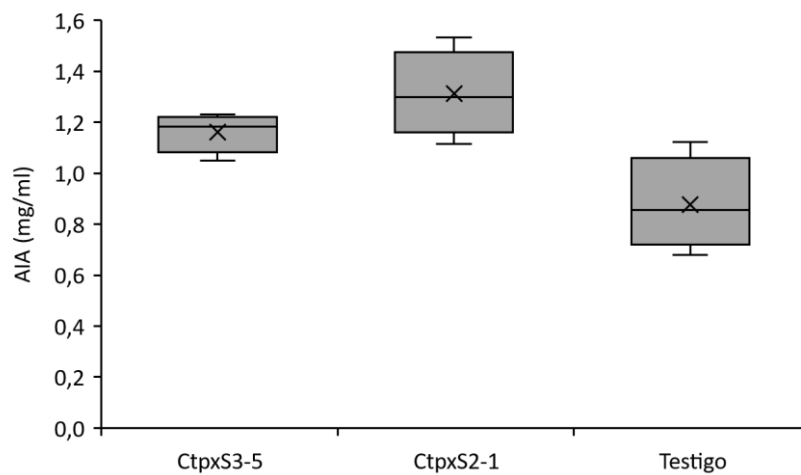


Figura 23 Efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento en los promedios y límites superiores e inferiores de auxinas (mg/ml) en hojas de *C. sativa* al final de la fase experimental

Fuente: Autoría propia

Coincidiendo con el estudio de Acurio *et al.* (2020) mediante el método colorímetro de Salkowski de cuatro cepas bacterianas de género *Bacillus* spp. en plantas de brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica) y lechuga (*Lactuca sativa*) de obteniendo valores de 8,40 ug/ ml y 11,40 ug/ml respectivamente de *B. megaterium* y *B.*

licheniformis obteniendo mayor capacidad para fijar nitrógeno, producir auxinas y solubilizar fosfatos.

3.1.2.5. Índice de clorofila

Los resultados obtenidos para el índice de clorofila a partir de métodos bioquímicos en hojas frescas de cáñamo no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se cuantificó el contenido de Chla+b en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx2-1, y con *B. subtilis* Ctpx3-5, presentando mayor contenido la cepa Ctpx2-1 de 24,99 (ug/ml) a comparación del tratamiento testigo de 19,93 (ug/ml) (Figura 24).

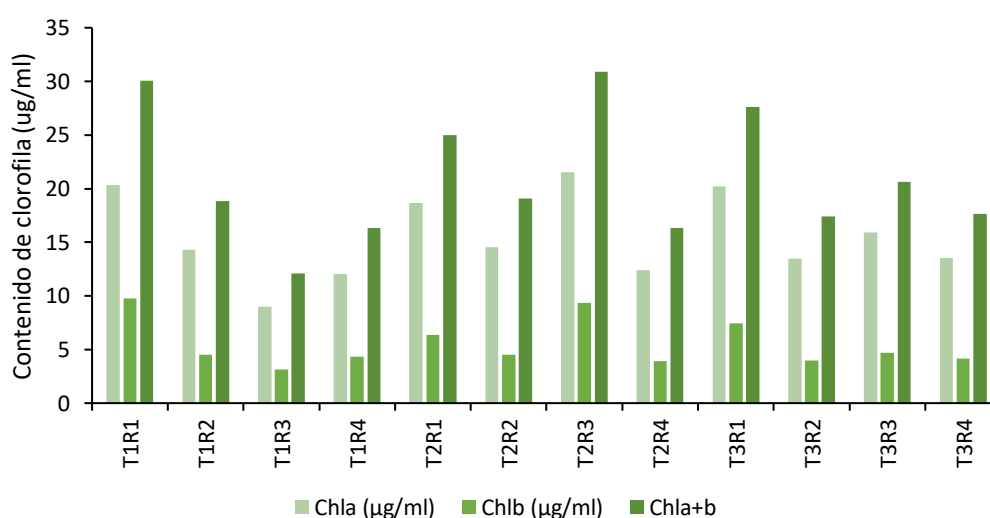


Figura 24 Efecto de *B. subtilis* en el contenido de clorofila a (*Chla*), clorofila b (*Chlb*) y clorofila total (*Chla+b*) en hojas de *C. sativa*.

Resultados que coinciden con Alamilla *et al.* (2020) realizado en plantas de acelga (*Beta vulgaris* var. *Cycla*), el tratamiento con *B. subtilis* (0,92mg/ml±0,25) y el tratamiento vermicomposta (0,92mg/ml±0,23) presentaron mayor concentración de clorofila a comparación del tratamiento testigo, permitiendo determinar el estado nutricional del cultivo de elementos como el nitrógeno, hierro y magnesio principalmente, a través de la determinación del contenido de clorofila en los tejidos vegetales debido a la producción de sideróforos permitiendo la captura de hierro cuando se encuentra limitado Camelo *et al.* (2011).

3.1.2.6. Sólidos solubles totales

Las medias obtenidas a partir de inoculaciones de *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml) en la rizósfera de cáñamo, no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, la rizosfera inoculada con la cepa CtpxS3-5 presentó mayor contenido de sólidos solubles totales (SST) de 5,38 mg/g de material fresco a comparación del tratamiento testigo con un menor valor de 4,00 mg/g (Figura 25).

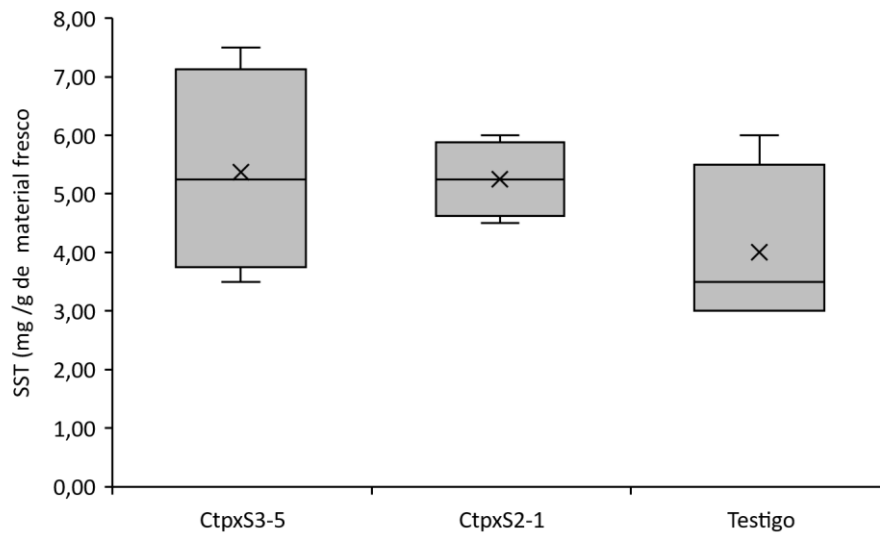


Figura 25 Efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento en los promedios y límites superiores e inferiores de sólidos solubles totales (mg/g) en hojas de *C. sativa* al final de la fase experimental

Fuente: Autoría propia

En el estudio de Bonilla *et al.* (2021) mencionan que en su experimento *B. subtilis* favoreció el crecimiento vegetal y el aumento de sólidos solubles totales comparado con el tratamiento control.

3.1.2.7. Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

Se evaluó la dinámica poblacional de la rizósfera de cáñamo inoculada de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpS3-5 por tratamiento y repetición recolectados cada 15 días. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento inoculado con la cepa CtpxS3-5 presentó $6,23 \log_{10}(\text{UCF g}^{-1})$ Unidades Formadoras de Colonias por gramo de rizósfera inoculada al final de la fase experimental a comparación del tratamiento testigo (Figura 26).

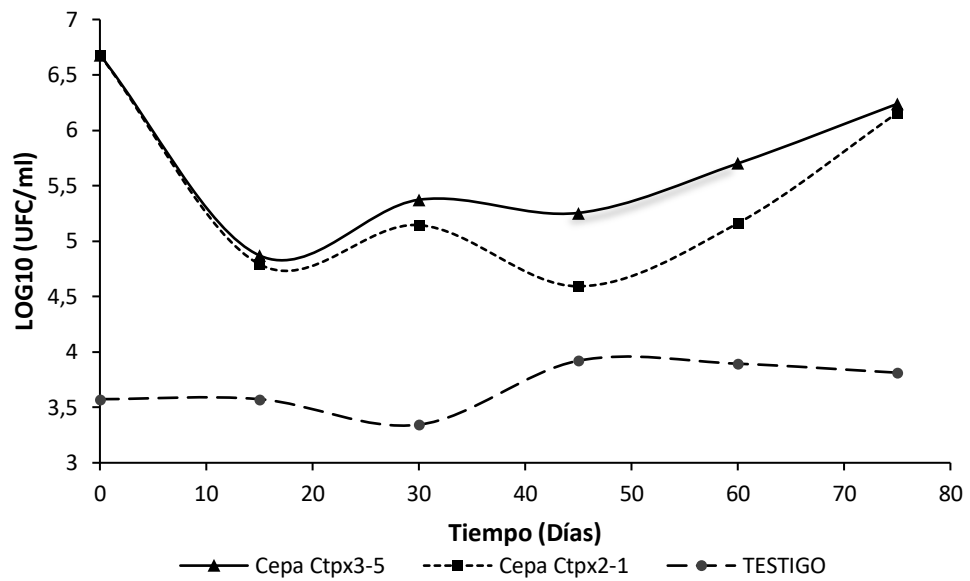


Figura 26 Dinámica poblacional de inoculaciones periódicas de cepas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5, en la rizósfera de plantas de cáñamo a lo largo de tres meses
Fuente: Autoría propia

Según, Falconí *et al.* (2022) en su estudio realizado la filósfera de *L. mutabilis* mediante pulverización de *B. subtilis* durante dos meses llegó a permanecer estable una vez que alcanza la adhesión y colonización en un periodo de tiempo de 7,0 log₁₀ (UFC g⁻¹), datos que coinciden con esta investigación donde la cepa CtpxS3-5 alcanza su estabilidad equivalente a 6,23 log₁₀(UCF g⁻¹),

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El efecto de dos cepas de *B. subtilis comercial*, utilizados en este estudio en la forma de células libres, tienen el potencial para reducir el desarrollo y crecimiento de *Fusarium spp*, responsable del Damping off en la etapa de semillero.

Se evidenció que las dos cepas de *B. subtilis comercial*, mediante mecanismos directos, tienen la capacidad de solubilizar los fosfatos, fijar el nitrógeno atmosférico e incrementar el contenido de AIA a nivel de rizósfera.

El efecto de dos cepas de *B. subtilis comercial* incrementaron el crecimiento de las plantas de cañamo.

Recomendaciones

Los resultados obtenidos en esta investigación recomiendan:

Usar *Bacillus subtilis* comercial (cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5), en programas de manejo integrado de enfermedades para el cultivo de cañamo.

Realizar aplicaciones de células libres en concentraciones 1×10^6 UFC ml⁻¹ de los aislados de *Bacillus subtilis* comercial (cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5), cada 30 días para asegurar su efectividad en campo en las plantas de cañamo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acurio, R., Mamarandi, J., Ojeda, A., Tenorio, E., Chiluisa Viviana, & Vaxa, I. (2020). Evaluación de *Bacillus* spp. como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y lechuga (*Lactuca sativa*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*.
<https://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/1465/731#info>
- Alamilla, I., Arias, A., Martínez, C., Zacaria, A., Vital, E., Fernández, G., & Chirino, G. (2020). Impacto de *Bacillus subtilis*-vermicomposta en el crecimiento de la acelga (*Beta vulgaris* var. *cycla*). *Revista Tendencias en Docencia e Investigación En Química 2020*, 6(6), 605. <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/7773>
- Ángeles, G., Brindis, F., Niizawa, C., & Martínez, R. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Rev. Mex. Cienc. Farm*, 45.
- Beltrán, M. (2014). Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101–113.
- Bonilla, R., González, L., & Pedraza, R. (2021). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible. In *Agrosavia*.
<https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7405019>
- Cabello, J., Flores, A., Olalde, V., Valdés, R., & Alcalá, E. (2019). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6, 1.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33802019000100113&script=sci_arttext&tlng=es#aff1
- Camelo, M., Vera, S., & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166.
<https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945031010.pdf>
- Castañeda, C., Almanza, P., Pinzón, F., Cely, G., & Serrano, P. (2018). Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 329–337.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v12n2/2011-2173-rcch-12-02-329.pdf>

- Cerón, L., & Aristizábal, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285–295. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752012000100026&script=sci_abstract&tlng=es
- Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M., Ramos, S., & Rodríguez, J. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45. <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- Corrales, L., Sánchez, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *Nova*, 12(22). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702014000200006
- Crini, G., Lichtfouse, E., & Crini, N. (2020). Applications of hemp in textiles, paper industry, insulation and building materials, horticulture, animal nutrition, food and beverages, nutraceuticals, cosmetics and hygiene, medicine, agrochemistry, energy production and environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 1451–1476.
- Díaz, A. (2018). *Evaluación de la actividad fitorreguladora de auxinas obtenidas a partir de un extracto de tallos de fréjol común (Phaseolus vulgaris L.) en cultivos de plantas in vitro* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/27503>
- Dweba, C., Figlan, S., Shimelis, H., Motaung, T., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., & Tsilo, T. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 114–122.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Nafiz, D. (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.
- Espinel, C., Villamizar, L., Torres, L., & Cotes, A. (2018). Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. *Agrosavia*, 1, 568. https://www.researchgate.net/publication/329247684_Hongos_entomopatogenos_en_el_control_biologico_de_insectos_plaga
- Falconí, C., Yáñez, V., & Claudio, D. (2022). Native *Bacillus subtilis* Strains Efficiently Control Lupin Anthracnose Both under Greenhouse and in Field Conditions. *International Journal on Advanced Science Engineering and Information*, 12(6).

https://www.researchgate.net/publication/366543793_Native_Bacillus_subtilis_Stra-ins_Efficiently_Control_Lupin_Anthraco-nose_Both_under_Greenhouse_and_in_Field_Conditions

- García, R. (2017). *Botrytis cinerea en el cultivo de Rosa híbrida en la zona florícola sur del Estado de México y la evaluación de su sensibilidad in vitro a fungicidas* [Universidad Autónoma del Estado de México]. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/68560>
- Gondal, A., Rauf, A., & Naz, F. (2019). Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan. *Scientific Reports* .
- González, B. (2019). *Análisis de máxima actividad de fosfatasas y fitasas de una bacteria seleccionada por su capacidad solubilizadora de fósforo* [Tesis de Pregrado, Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/1768/1/IGLIN-248727-1119-1119-%20Beatriz%20Gonz%c3%a1lez%20Arias%20%20-A.pdf>
- Hanan, A., & Mondragón, J. (2009). *Cannabis sativa L. Malezas de México, 1*.
- Intriago, L. (2021). *Efecto del tratamiento de semillas con Zn sobre la germinación y vigor de plántulas de maíz dulce (Zea mays L.) var. Bandit* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26766/1/T-IASA%20I-004407.pdf>
- Kashyap, B., Solanki, M., Pandey, A., Prabha, S., Kumar, P., & Kumari, B. (2019). *Bacillus as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Promising Green Agriculture Technology*. *Researchgate*, 219–236.
- LASA. (2021). *El cannabis: un mercado de expansión en el Ecuador – Laboratorio Lasa*. <https://laboratoriolasa.com/el-cannabis-un-mercado-de-expansion-en-el-ecuador/>
- Mahmoud, M., BenRejeb, I., Punja, Z., Buirs, L., & Jabali, S. (2023). Understanding bud rot development, caused by *Botrytis cinerea*, on cannabis (*Cannabis sativa L.*) plants grown under greenhouse conditions. *Botany*.
- Martínez, M., & Moreno, Z. (2008). *Estandarización de una metodología para la evaluación de eficiencia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de botrytis sp, en condiciones semicontroladas* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8532>

- Mishchenko, S., Mokher, J., Laiko, I., Burbulis, N., Kyrychenko, H., & Dudukova, S. (2017). Phenological growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.): codification and description according to the BBCH scale. *ŽEMĖS ŪKIO MOKSLAI*, 24(2), 31–36.
- Monsalve, O., Gutiérrez, J., & Cardona, W. (2017). Factors involved in the process of nitrogen mineralization when organic amendments are added to a soil. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1).
- Patiño, M., Rodríguez, G., & Betancourt, M. (2022). Identification and characterization of diseases in *Cannabis sativa* L. *Temas Agrarios*, 27(1).
- Pérez, C. (2018). *Sensibilidad de Rhizoctonia solani A Trichoderma spp in vitro* [Universidad Rafael Landívar]. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/06/14/Perez-Carlos.pdf>
- Porras, R. (2021). La morfología y fisiología entre las subespecies y sexos del Cannabis. *Clinical Research Insider*, 5.
- Romero, A., Arias, R., & Mendoza, R. (2019). Isolation and selection of solubilizing phosphate soil fungi native to Coahuila state, México. *Acta Botánica Mexicana*, 126, 2448–7589. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-71512019000100111&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Ruiz, M., Ornelas, J., Olivas, G., Acosta, C., Sepúlveda, D., Zamudio, P., Berlanga, D., Salas, M., Cambero, O., & Rios, C. (2020). Efecto de cepas de *Bacillus solas* y en interacción con hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. *Revista Bio Ciencias*, 6.
- Serrano, M., Pérez, L., Estrada, H., Mancera, R., & Aranguren, Y. (2022). Identification and characterization of native nitrogen-fixing rhizobacteria from capsicum sp. In caribbean region of Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 15(2). <http://portal.amelica.org/ameli/journal/130/1303297004/1303297004.pdf>
- Wimalasiri, E., Jahanshiri, E., Chimonyo, V., Kurupparachchi, N., Suhairi, T., & Azam-Ali, S. (2021). A framework for the development of hemp (*Cannabis sativa* L.) as a crop for the future in tropical environments. *Industrial Crops and Products*, 172(15).
- Yadav, J., Verma, J., & Tiwari, K. (2010). Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under in vitro

conditions. *Biological Forum An International Journal*, 2(2), 15–18.
<https://www.researchtrend.net/bfij/bf22/4 KN TIWARI.pdf>

Yáñez, V. (2012). *Potencial de la cepa CPA–8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta* [Tesis Doctoral, Universidad de Lleida]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf>

Yáñez, V., & Falconí, C. (2018). Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. *Biological Control*, 122, 67–75.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964418302329>

Yáñez, V., & Falconí, C. (2021). *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters*, 43, 719–728. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-020-03066-x>