



Evaluación de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de fitasas, nitrogenasas y crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero

González Tinta, Siomara Joaquina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César Eduardo PhD

23 de junio del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de titulación: **Evaluación de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de fitasas, nitrogenasas y crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero**, fue realizado por la señorita **González Tinta, Siomara Joaquina**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 23 de junio del 2023



Firmado electrónicamente por:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

.....
Ing. Falconí Saá, César Eduardo PhD

C. C. 0601556459

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos

23/6/23, 09:47

SIOMARA JOAQUINA GONZALEZ TINTA

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Antiplagio tesis

NOMBRE DEL ALUMNO

SIOMARA JOAQUINA GONZALEZ TINTA

NOMBRE DEL ARCHIVO

SIOMARA JOAQUINA GONZALEZ TINTA

SE HA CREADO EL INFORME

23 jun 2023

Resumen

Fragmentos marcados	3	0,3 %
Fragmentos citados o entrecuillados	1	0,1 %

Coincidencias de la Web

agrosavia.co	2	0,2 %
unicolmayor.edu.co	1	0,1 %
bab.la	1	0,1 %



FALCONI SAÁ, CÉSAR EDUARDO PHD
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

.....
Ing. Falconí Saá, César Eduardo PhD

C. C. 0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **González Tinta, Siomara Joaquina**, con cédula de ciudadanía n° 1715744957, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de fitasas, nitrogenasas y crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 23 de junio del 2023


.....
González Tinta, Siomara Joaquina

C.C. 1715744957



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **González Tinta, Siomara Joaquina**, con cédula de ciudadanía n° 1715744957, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de fitasas, nitrogenasas y crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.**

Sangolquí, 23 de junio del 2023

.....
González Tinta, Siomara Joaquina

C.C. 1715744957

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado primeramente a mis hijos, Juan André y Tiana que a pesar que hubo días que nos tocó las adversidades la puerta, siempre fueron mi lucecita que nunca dejó rendirme, quiero dedicarles mis días de desvelo, mis días agotadores porque en los momentos difíciles estuvieron ahí y este fue el resultado y el ejemplo que quiero entregarles, que a pesar de todo siempre luchen por sus sueños y sus metas mis hijos, mi todo.

Mis padres, Oscar mi angelito que ha a pesar que tuviste que marcharte muy pronto, cada vez que te oré, y necesitaba un abrazo tuyo te sentí siempre a mi lado y a mi mami Esperanza, las palabras infaltables de amor y apoyo que nunca faltaron mamita; les dedico papitos míos este esfuerzo porque es lo que soñé desde el primer día que decidí ser ingeniera y siempre me apoyaron.

Mis hermanos, Veri, Kari y Osqui mis super hermanos, que siempre me aconsejaron guiándome en las decisiones que debía tomar, les dedico este trabajo porque fueron parte de mis días buenos, malos y siempre estuvieron junto a mí...

Y mi querido Juan Francisco mi esposo, que han sido años de subidas y bajadas pero este trabajo, este esfuerzo te dedico, porque fuiste parte de todo este proceso, y más ahora que necesité un apoyo siempre tus palabras de aliento y admiración no faltaron, gracias por ser mi columna que no dejó que me desmorone en ningún momento.

Y a mi director de tesis doctor Falconí, dedico este trabajo porque gracias a su direccionamiento y el apoyo que nunca faltó pude cumplir mi meta.

Agradecimientos

En el transcurso de la carrera muchas personas realmente importantes me ayudaron e impulsaron a cumplir esta meta, entre ellos

A mi director de tesis Ing. Falconí que mediante sus conocimientos me direccionó de mejor manera para que este trabajo sea posible,

Ing. Darwin un apoyo incondicional en todo este proceso, ya que nunca faltaron los mejores consejos para lograr este objetivo.

Doc. Rueda, siempre pendiente de cada detalle me direccionó para cumplir esta meta y con aquella frase que me leyó y quedará siempre marcada en cada camino que tome "si es para ti llegará de la forma más perfecta...",

Mis padres, papitos ese título va para ustedes, lo logré.... gracias por cuidarme desde el cielo papito y alentarme y abrazarme tan fuerte mamita.

A mis hermanos, Kari, Osqui y Veri, y sin faltar mis hermosos sobrinos Alejito, Isabelita, Rapha, Marti, que fueron parte de mi sueño.

A mis hijos Tiana y André y mi esposo Juan Francisco les agradezco porque fueron muchas circunstancias y tiempo que Dios nos ha dado, que me impulsaron a tomar grandes decisiones y que ahora son parte de mi meta que tanto soñé y que tanto anhelé.

A mis amigos...Marco, cuando tus llamadas venían después de mucho tiempo, pero le atinabas el momento indicado para aconsejarme o hacerme reír y sin faltar tu apoyo incondicional. Jordhy, Michu, Marito, Juanita, Kate, Oswaldo y muchas otras más personas que estuvieron ahí alentándome, y de una y otra manera me apoyaron, siempre las llevo en mi corazón.

Les agradezco a cada uno por darme la oportunidad de demostrar que las dificultades no son pretexto para dejar las cosas, que ser madre de dos hermosos niños no fue impedimento para terminar mi carrera y todo lo que soy ahora es por un aliento de cada uno de ustedes...

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Resumen	15
Abstract.....	16
CAPÍTULO I	17
INTRODUCCIÓN	17
Antecedentes	17
Justificación	18
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	19
CAPÍTULO II	20
MARCO REFERENCIAL	20
Cultivo de chocho en el Ecuador	20

Descripción botánica del chocho.....	21
Etapas fenológicas del cultivo de chocho	23
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	24
Bacillus	26
Bacillus subtilis.	26
Formación de biopelículas.	26
Producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal.	26
Producción de sideróforos	29
Antagonismo contra otros microorganismos	29
Biofertilizante.....	30
Dinámica del Nitrógeno	30
Nitrogenasas de Bacillus	32
Dinámica del Fósforo	35
Fosfatasa de Bacillus.....	37
CAPÍTULO III.....	40
METODOLOGÍA.....	40
Ubicación del área de investigación	40
Instalación del proyecto	41
Materiales	42
Insumos.....	42
Medios de cultivo	42
Biológicos	43
Equipos.....	43
Métodos.....	43

Inoculación de <i>B. subtilis</i> CtpxS2 y CtpxS3-5 en semillas de chocho (<i>L. mutabilis</i>)	43
Establecimiento de plántulas de chocho (<i>L. mutabilis</i>) en el invernadero	44
Inoculación de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2 y CtpxS3-5 en plántulas de chocho (<i>L. mutabilis</i>)	45
Variables evaluadas.....	46
Variables agronómicas	46
Dinámica poblacional de <i>Bacillus subtilis</i>	46
Variables fisiológicas	47
Análisis de información	56
CAPÍTULO IV	58
RESULTADOS	58
Variables agronómicas	58
Altura de la planta	58
Área de raíces.....	59
Dinámica poblacional de <i>Bacillus subtilis</i>	60
Variables fisiológicas	61
Fijación de nitrógeno atmosférico.....	61
Índice de contenido de clorofila	63
Sólidos solubles totales	65
Solubilización de fosfatos	66
Detección y cuantificación de auxinas.....	68
CAPÍTULO IV	69
DISCUSIÓN	69
CAPÍTULO VI	74
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
Conclusiones	74

Recomendaciones	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76

Índice de tablas

Tabla 1 Descripción botánica del chocho (<i>L. mutabilis</i>)	21
Tabla 2 Etapas fenológicas del cultivo de chocho (<i>L. mutabilis</i>)	23
Tabla 3 Descripción de los tratamientos.....	41
Tabla 4 Curva estándar para la determinación de proteína por espectrofotometría	49
Tabla 5 Estándares para la curva de calibración de AIA	55
Tabla 6 Promedio \pm desviación estándar del contenido de clorofila total (<i>Chla+b</i>), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.	65
Tabla 7 Promedio \pm desviación estándar del contenido de sólidos solubles totales (<i>SST</i>), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.	66
Tabla 8 Promedio \pm desviación estándar del contenido de auxinas (<i>AIA</i>), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.	68

Índice de figuras

Figura 1 Producción de chocho en toneladas métricas (Tm) por provincias en el Ecuador	20
Figura 2 Mecanismos directos e indirectos y sus capacidades de activación en la promoción del crecimiento (PGPB)	25
Figura 3 Biosíntesis del ácido indol acético (AIA)	28
Figura 4 Ciclo del nitrógeno	31
Figura 5 Mecanismo de acción de la nitrogenasa	35
Figura 6 Ciclo del fósforo	36
Figura 7 Mecanismos inorgánicos y orgánicos de solubilización de fosfatos por microorganismos.	38
Figura 8 Ubicación satelital del sitio de estudio.....	40
Figura 9 Diseño experimental del ensayo en invernadero	42
Figura 10 Inoculación de <i>B. subtilis</i> CtpxS2 y CtpxS3-5 en semillas de chocho (<i>L. mutabilis</i>)	44
Figura 11 Establecimiento de plántulas de chocho (<i>L. mutabilis</i>) en el invernadero	45
Figura 12 Dinámica poblacional de <i>Bacillus subtilis</i>	47
Figura 13 Cuantificación de nitrógeno en hojas frescas de <i>L. mutabilis</i>	50
Figura 14 Medición del índice de clorofila en hojas colectadas de <i>L. mutabilis</i>	51
Figura 15 Cuantificación de sólidos solubles totales.....	53
Figura 16 Detección y cuantificación de auxinas en raíces de <i>L. mutabilis</i>	56
Figura 17 Altura de las plantas de chocho (cm) durante tres meses de aplicación, a partir de la formación de plántulas (30 días).....	58
Figura 18 Correlación entre el área y volumen de raíces de chocho tratadas con <i>B. subtilis</i> cepa CtpxS2-1 y CtpxS3-5	59
Figura 19 Dinámica poblacional de inoculaciones periódicas de <i>B. subtilis</i> Ctpx2-1 y Ctpx3-5, en la rizósfera de plantas de chocho a lo largo de tres meses.	60

Figura 20 Dilución y plateo de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} UFC/ml) colectado de la rizósfera de chocho y crecido en medio NYDA	61
Figura 21 Inoculaciones en medio Ashby Manitol de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml).	62
Figura 22 Representación de los promedios y límites superiores e inferiores del contenido proteico por cada gramo de material seco en hojas de <i>L. mutabilis</i> producto de inoculaciones con <i>B. subtilis</i>	63
Figura 23 Efecto de inoculaciones periódicas de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx2-1, Ctpx3-5 y testigo en hojas de <i>L. mutabilis</i>	64
Figura 24 Efecto de inoculaciones periódicas de dos cepas de <i>B. subtilis</i> en clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y clorofila total (Chla+b) en hojas de <i>L. mutabilis</i>	64
Figura 25 Inoculaciones de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio Pikovskaya, dilución 10^{-3}	67
Figura 26 Efecto de inoculaciones con dos cepas de <i>B. subtilis</i> en los promedios y límites superiores e inferiores de auxinas (mg/ml) en hojas de <i>L. mutabilis</i> a lo largo de tres meses	68

Resumen

B. subtilis pertenecen al grupo de PGPR que facilitan el desarrollo y regulación de parámetros fisiológicos, bioquímicos y morfológicos en los cultivos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de inoculaciones periódicas de *B. Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de nitrogenasas, fitasas, y crecimiento del chocho bajo invernadero durante tres meses. Inicialmente se desinfectaron e inocularon ocho semillas de chocho por tratamiento (T1: *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), T2: *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3: agua destilada), que una vez germinadas en semilleros se trasplantaron a rizotrones, ubicados en el invernadero de Fitopatología y Control biológico de la Carrera Agropecuaria IASA. Los resultados obtenidos sobre variables agronómicas, se evidenció que el 65% de los datos obtuvieron respuestas positivas a inoculaciones con *B. subtilis* CtpxS3-5 en la altura. Las raíces de las plantas de chocho tratadas con *B. subtilis* CtpxS3-5, obtuvieron correlaciones significativas ($r=0,84$) entre el volumen y área superiores al testigo. En cuanto a la colonización de la rizósfera, la cepa Ctpx2-1 tuvo mayor número de UFC/g, iniciando su estabilidad de 5,82 log₁₀ (UFC/g) al final del estudio. Respecto al efecto sobre parámetros fisiológicos, el tratamiento de *B. subtilis* CtpxS3-5 presentó mayor respuesta en la fijación de nitrógeno con 8842,05 mg/g; índice de clorofila con valores que fluctuaron entre 26 a 44 unidades de CCI; sólidos solubles totales con diferencias significativas promedio de 5,25 (mg/g); solubilización de fósforo evidenciando cambio de color alrededor de las colonias; y mayores concentraciones de AIA en las raíces 21,5 mg/ml.

Palabras clave: *B. SUBTILIS* CTPXS2-1, *B. SUBTILIS* CTPXS3-5, PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO, FITASAS, NITROGENASAS.

Abstract

B. subtilis belong to the group of PGPR that facilitate the development and regulation of physiological, biochemical and morphological parameters in crops. The objective of this study was to evaluate the effect of periodic inoculations of *B. subtilis* CtpxS2-1 and CtpxS3-5 on the increase of nitrogenases, phytases, and lupine growth under greenhouse conditions for three months. Initially, eight lupine seeds were disinfected and inoculated per treatment (T1: *B. subtilis* CtpxS2-1 (1x10⁶ CFU/ml), T2: *B. subtilis* CtpxS3-5 (1x10⁶ CFU/ml), T3: distilled water), then one Once germinated in seedbeds, they were transplanted to rhizotrons, located in the Phytopathology and Biological Control greenhouse of the IASA Agricultural Career. The results obtained on agronomic variables; it was evidenced that 65% of the data obtained positive responses to inoculations with *B. subtilis* CtpxS3-5 at height. The roots of the lupine plants treated with *B. subtilis* CtpxS3-5, obtained significant correlations ($r=0.84$) between the volume and area higher than the control. As for the colonization of the rhizosphere, the Ctpx2-1 strain had the highest number of CFU/g, starting its stability at 5.82 log₁₀ (CFU/g) at the end of the study. Regarding the effect on physiological parameters, the treatment of *B. subtilis* CtpxS3-5 presented a greater response in nitrogen fixation with 8842.05 mg/g; chlorophyll index with values that fluctuated between 26 to 44 CCI units; total soluble solids with mean significant differences of 5.25 (mg/g); phosphorus solubilization showing color change around the colonies; and higher concentrations of IAA in the roots 21.5 mg/ml.

Keywords: *B. SUBTILIS* CTPXS2-1, *B. SUBTILIS* CTPXS3-5, GROWTH PROMOTION, PHYTASES, NITROGENASES.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) son bacterias que se pueden encontrar en la rizósfera, superficie de raíces y en asociación con las raíces, facilitando la absorción de nutrientes en ciertas plantas, mediante 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 secretando sustancias antagónicas contra microorganismos fitopatógenos, 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).

A su vez, en la crisis de 1970 debido a la alta contaminación por fertilizantes nitrogenados se llevaron 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 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 *Bacillus Ctpx 2-1* y *B. subtilis Ctpx 3-5* 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), (Falconí & Yáñez, 2022).

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

Justificación

Actualmente, suelos de alrededor de 1900 millones de hectáreas en todo el mundo se ven afectados por su degradación; al ser un recurso no renovable y de soporte fundamental para la agricultura, se ha buscado generar estrategias amigables y sostenibles que mejoren la productividad del suelo y la obtención de productos agrícolas de buena calidad. Mediante procesos metabólicos de los microorganismos del suelo, originan compuestos orgánicos, fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y producción de sustancias promotoras de crecimiento como auxinas permitiendo el desarrollo de los cultivos (Sánchez *et al.*, 2021).

Mediante mecanismos directos las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal pueden solubilizar, y trasladar los nutrientes hacia las raíces de las plantas (Sánchez *et al.*, 2021). Estos mecanismos de acción han sido evidenciados en el género *Bacillus*, bacteria gram positiva estudiada por su gran diversidad en los agrosistemas acuáticos como terrestres, debido a su habilidad para formar endosporas metabólicamente inactivas pero viables bajo condiciones adversas haciéndolos apropiadas para formular biofertilizantes que beneficien a los cultivos agrícolas (Villareal *et al.*, 2018).

Por medio de la biofertilización, se permite la disponibilidad de nutrientes que al aplicar a los cultivos facilitan la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos (SF) entre otras actividades, obteniendo el desarrollo de productos biológicos comerciales de uso agrícola. Por tal razón, es importante conocer que microorganismos contienen fitasas y nitrogenasas que beneficien la producción agrícola (Corrales *et al.*, 2017).

Tomando en consideración las características positivas de *Bacillus* y la necesidad de aplicar estrategias amigables y sostenibles que mejoren el crecimiento y la productividad del suelo se propone el uso de estas bacterias como alternativa en la promoción del crecimiento y fijación biológica del nitrógeno de plantas de chocho.

Objetivos

Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de nitrogenasas, fitasas, y crecimiento del chocho bajo invernadero.

Objetivos específicos

- ✓ Estimar el efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la altura de la planta y el área de las raíces del chocho.
- ✓ Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentes en la rizósfera del suelo del chocho, cada 15 días durante tres meses.
- ✓ Determinar el efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre parámetros fisiológicos (fijación de nitrógeno, índice de clorofila, sólidos solubles totales, solubilización de fósforo y auxinas) en plantas de chocho.

Hipótesis

- ✓ H0: Las inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no incrementan nitrogenasas, fitasas y el crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero.
- ✓ H1: Las inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 incrementan nitrogenasas, fitasas, y el crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero.

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIAL

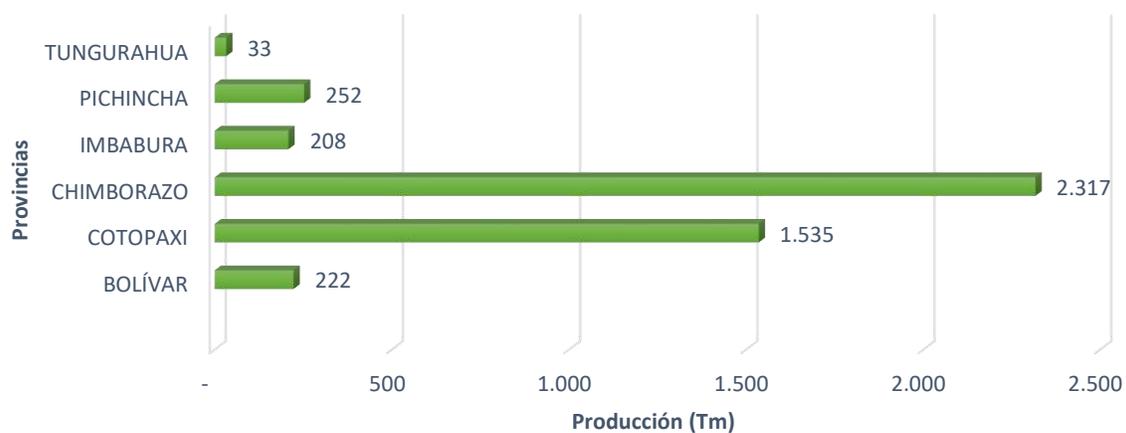
Cultivo de chocho en el Ecuador

El lupino andino (*L. mutabilis*), perteneciente a la familia de las fabáceas, se cultiva tradicionalmente en la zona Andina de América entre los 2500 msnm a 3600 msnm, especialmente en países como: Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, siendo uno de los alimentos nativos más importantes debido a su alto contenido de proteína, fibra, calcio, fósforo, hierro (Peralta, 2016), (Falconí & Yáñez, 2022).

En el Ecuador, esta leguminosa ha sido poco cultivada con una superficie total a nivel nacional de 5674 ha (4,217 ha como cultivo solo y 1.757 ha como cultivo asociado), establecido en seis provincias de la sierra ecuatoriana: Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha, Bolívar, Imbabura y Tungurahua, considerado como cultivo principal de rotación debido a su capacidad de fijar nitrógeno (Falconí & Yáñez, 2022). Alcanzando, en la provincia de Chimborazo una mayor producción de chocho (grano seco) cerca 2317 t, seguidas de Cotopaxi con 1535 t y Pichincha con 252 t como indica en la figura 1 (Yumbra, 2006).

Figura 1

Producción de chocho en toneladas métricas (Tm) por provincias en el Ecuador

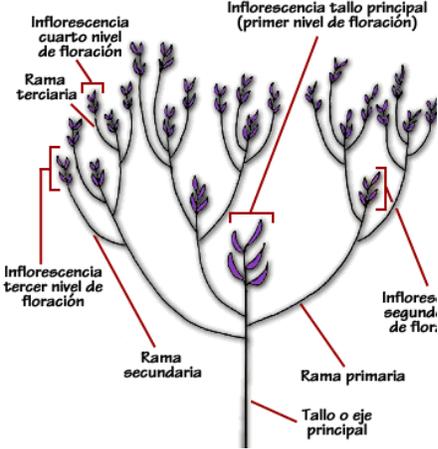


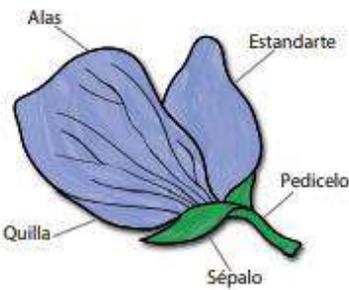
Nota. Recuperado de Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (2021).

Descripción botánica del chocho

Tabla 1

Descripción botánica del chocho (*L. mutabilis*)

Descripción Botánica	Características
Semilla 	<ol style="list-style-type: none">1. Forma: aplastada, redonda u ovalada casi cuadrangular.2. Mide: 0,5 a 1,5 cm (depende de la variedad).3. Color: entre blanco, amarillo, gris, ocre, entre otros.4. Peso: cada 100 unidades oscilan entre 25 y 60 g.5. Recubierta por tegumento endurecido (10% peso total).6. Contiene alcaloides que le dan su sabor amargo.
Sistema de raíces 	<ol style="list-style-type: none">1. Luego de emerger la plántula el crecimiento de la raíz es rápido conformando una raíz pivotante, vigorosa y profunda.2. Profundidad: de 1 m con múltiples ramificaciones, raicillas y pelos radicales.3. Desarrolla proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes: del género <i>Rhizobium lupini</i>, formando nódulos.<ul style="list-style-type: none">• Tamaño: 1 a 3 cm.• Se forman a partir del quinto día después de la germinación• Se ubican principalmente en la raíz primaria.
Tallo principal y ramas 	<ol style="list-style-type: none">1. Determinado por ejes laterales<ul style="list-style-type: none">• El tallo es el eje principal que termina en inflorescencia.• A partir de las yemas axilares se generan ramas primarias (ejes de primer orden), generando nuevos ejes continuamente va creciendo.• Crecimiento o ramificación simpodial (prominente) y no prominente.2. Las ramas y el tallo principal siempre terminan en inflorescencia con alto contenido de fibra y celulosa.

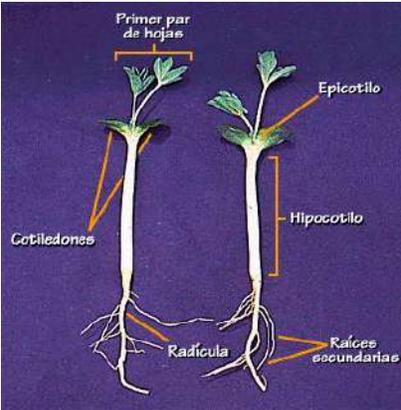
Descripción Botánica	Características
	<ol style="list-style-type: none"> Tallos gruesos, huecos y de estructura leñosa hacia la madurez. La altura puede variar de 0,4 y 2,0 m.
<p>Hojas</p> 	<ol style="list-style-type: none"> Medianas, palmeadas y compuestas. Presentan entre 5 a 11 foliolos de forma oblonga y digitada. En la base del peciolo se encuentran hojas estipulares. Puede variar su color dependiendo del contenido de antocianina.
<p>Flores</p> 	<ol style="list-style-type: none"> Flores grandes, en racimos terminales dispuestas verticalmente. <ul style="list-style-type: none"> Entre 20 y 80. Cada flor tiene 5 pétalos (un pétalo estandarte, dos pétalos laterales o alas y dos pétalos inferiores o quilla), forma típica de las papilionáceas. Las flores se unen al racimo por pedicelos cortos. Pueden ser blancas, azuladas o violetas (varia su coloración desde el inicio de su formación hasta la madurez). Altos niveles de autopolinización y polinización cruzada (5 - 10 %). Números de racimos: 1-10.
<p>Vainas o legumbres</p> 	<ol style="list-style-type: none"> Planas y agudizadas en forma curva en los extremos. Miden: 7-15 cm de largo y 1,3 -2,0 ancho. Pubescentes de color verde oscuro. Contienen 3-6 semillas por vaina. El número de vainas por planta varía entre 10-80.

Nota. Recuperado de Zavaleta (2018).

Etapas fenológicas del cultivo de chocho

Tabla 2

Etapas fenológicas del cultivo de chocho (L. mutabilis)

Etapa fenológica	Características
<p data-bbox="199 514 462 546">Etapa de germinación</p> 	<ol data-bbox="649 514 1421 976" style="list-style-type: none">1. Imbibición de la semilla.2. Aparición de la radícula (gran elongación).3. Los cotiledones son conducidos por el hipocótilo sobre el nivel del suelo (germinación epigea), entre los 15 y 25 días después de la siembra.4. Al terminar el crecimiento del hipocótilo empieza el crecimiento del epicótilo para dar paso a las primeras hojas<ul data-bbox="665 892 1421 976" style="list-style-type: none">• Las plántulas tienen de 4 a 5 hojas verdaderas.• Alrededor de 30 días.
<p data-bbox="199 1050 422 1081">Etapa de floración</p> 	<ol data-bbox="649 1050 1421 1564" style="list-style-type: none">1. La floración va progresivamente en la medida que se desarrollan las ramificaciones.<ul data-bbox="665 1155 1421 1302" style="list-style-type: none">• Del brote terminal aparece el primer racimo floral o eje central de la planta.• Ocurre a los 100 a 120 días de la siembra.2. Puede alcanzar 3- 4 pisos de floración.<ul data-bbox="665 1365 1421 1564" style="list-style-type: none">• Competencia de vainas cuajadas.• Crecimiento vegetativo y reproductivo al mismo tiempo.• El número de flores en el primer nivel de floración es mayor disminuyendo paulatinamente.
<p data-bbox="199 1638 527 1669">Etapa de llenado de granos</p>	<ol data-bbox="649 1638 1421 1845" style="list-style-type: none">1. Etapa de elongación de vainas el promedio de granos es bajo.2. Al alcanzar su tamaño ideal el peso de grano aumenta en forma lineal.

Etapa fenológica	Características
	<p data-bbox="651 302 1425 386">3. Los granos permanecen verdes hasta madurez fisiológica cambiando paulatinamente de color a blancos.</p> <ul data-bbox="699 411 1425 495" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="699 411 1425 443">• Fructificación: alrededor de 120- 210 días <li data-bbox="699 464 1425 495">• Maduración: 181 -210 días

Nota. Recuperado de Zavaleta (2018); (FAO 1982).

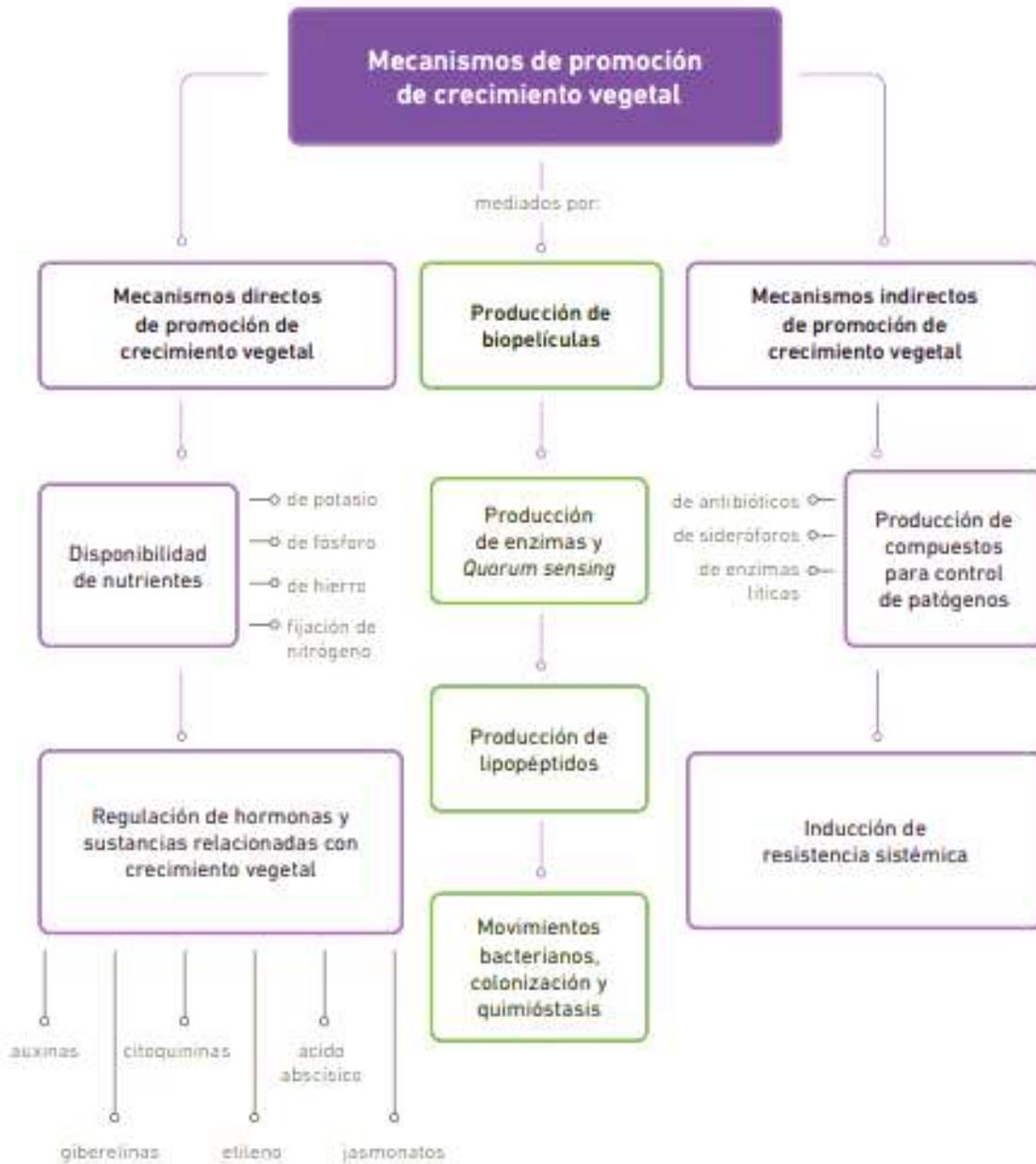
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en las plantas (PGPR), incluyen variedad de especies como: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia*, que mejoran la calidad y crecimiento de las plantas, utilizando mecanismos de quimiotaxis directos e indirectos (Figura 2) sobre su habilidad de colonizar la rizósfera, manteniendo la comunicación entre microorganismos del suelo y células de la raíz (Yadav *et al.*, 2010).

Los mecanismos directos están relacionados con: 1) la disponibilidad y solubilización de nutrientes (fosfato inorgánico), 2) fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico, 3) producción de nitrógeno orgánico y aminoácidos, 4) producción de hormonas reguladoras de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberilinas. Indirectamente las rizobacterias pueden actuar como controladores biológicos, producción de antibióticos y de sideróforos estimulando simbiosis benéfica para la planta, tal como indica la figura 2 (Camelo *et al.*, 2011).

Figura 2

Mecanismos directos e indirectos y sus capacidades de activación en la promoción del crecimiento (PGPB)



Nota. Recuperado de Camelo *et al.* (2011).

Bacillus

Bacillus subtilis.

B. subtilis, bacilo Gram positivo, aerobio estricto, capaz de producir endoesporas (ovales o cilíndricas), antibióticos y matriz extracelular denominada biofilm. En medio in vitro las colonias de *Bacillus* son de coloración blanca, opaca, consistencia viscosa, de margen ondulado, elevación plana, forma irregular y tamaño variable (0,5 a 10 μm) (Yáñez, 2012).

El género *Bacillus* presenta un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de especies crecen a una temperatura de 30 a 45 °C (mesófilas) (Villareal *et al.*, 2018).

Formación de biopelículas.

Las bacterias se encuentran en poblaciones o comunidades, comportándose de forma coordinada y compleja, debido a la producción de sustancias extracelulares que permitirán la adherencia de las colonias bacterianas en superficies bióticas o abióticas, especialmente en las raíces de las plantas o agregados de suelo, mediante la formación de biopelículas microbianas, conformadas por compuestos que la bacteria mismo produce como proteínas, metabolitos secundarios, ácidos orgánicos y péptidos (Bonilla *et al.*, 2021).

Producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

Las rizobacterias (PGPR) son capaces de producir sustancias orgánicas como auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquininas, permitiendo el desarrollo y regulación de parámetros fisiológicos, bioquímicos y morfológicos (Camelo *et al.*, 2011).

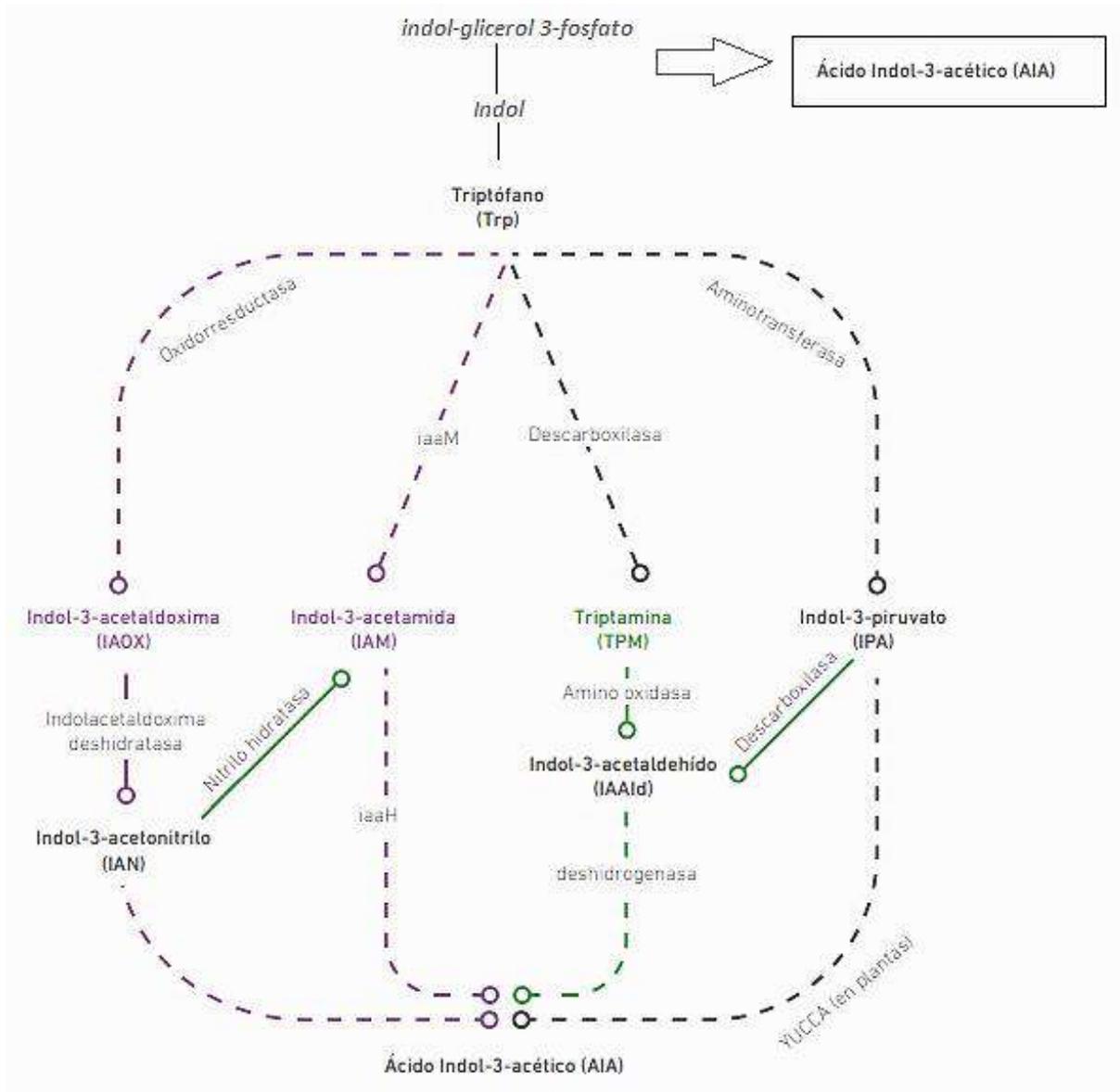
Las citoquininas producidas por la planta mediante procesos endógenos o exógenos permiten aumentar el proceso de crecimiento, por medio de la inducción de la actividad amilasa, proteasa y la síntesis de auxinas. El ácido indol acético (AIA), principal auxina encargada de la formación de dominios apicales, diferenciación vascular, división celular, fototropismo y el desarrollo de órganos, especialmente en la formación del xilema y raíz de la planta (Vega *et al.*, 2016).

La biosíntesis del ácido indol acético (AIA) está conformado por cinco rutas de biosíntesis, de las cuales, cuatro son dependientes de triptófano (Trp) y una es independiente que inicia su proceso con indol-3-glicerol fosfato (IGP) para producir IAA (Figura 3).

Por lo tanto, el triptófano, aminoácido precursor de la biosíntesis de AIA en bacterias, está ligado principalmente a cuatro rutas metabólicas encargadas de la producción de compuestos indólicos: la primera vía el triptófano (Trp) es convertido en indol-3-acetaldoxima (IAOX), que a partir de indolaceldoxina dishidratasa se convierte en indol-3-acetonitrilo (IAN) para formar continuamente ácido indol acético (AIA), en la segunda vía el (Trp) a partir de monooxigenasa es convertido en indol-3-acetamida (IAM) y mediante una hidrolasa (IAM) es convertida en AIA, en la tercera vía el triptófano (Trp) a partir de una descarboxilasa se forma la triptamina (TPM), a continuación mediante una amino oxidasa formará indol-3-acetaldehído (IAAId) y finalmente convertido a IAA por una deshidrogenasa, y en la cuarta vía el triptófano a partir de una aminotransferasa es convertido a indol-3-piruvato (IPA) para continuamente por acción de la enzima YUCCA (flavina monooxigenasa) se transforme a AIA, tal como indica en la figura 3 (Bonilla *et al.*, 2021).

Figura 3

Biosíntesis del ácido indol acético (AIA)



Nota. Biosíntesis del ácido indol acético conformada por cuatro rutas dependientes de triptófano como: indol-3-Acetaldoxamina (IAOX), indol -3- acetamida (IAM), triptamina (TPM) e indol-3piruvato (IPA), y una ruta independiente a partir de indol glicerol – 3 fosfato. YUCCA= Flavina monooxidasa. Recuperado de Bonilla *et al.* (2021).

Producción de sideróforos.

B. subtilis bacteria promotora de crecimiento, es capaz de producir compuestos quelantes tales como los sideróforos, compuestos de bajo peso molecular, que actúan manteniendo el hierro en el suelo, especialmente cuando la disponibilidad del micro elemento se encuentra en condiciones limitantes, de esta forma, lo solubilizan e incorporan en el metabolismo celular de forma de ion ferroso (Fe^{+2}) o férrico (Fe^{+3}) (forma común en el suelo), que implica el transporte y la liberación de hierro dentro de la célula, mediante reacciones de óxido reducción, reguladas por proteínas que dependen del hierro, pH y trazas de carbono, nitrógeno y fósforo (Camelo *et al.*, 2011).

Al solubilizar hierro del suelo por los sideróforos, los microorganismos lo sintetizan para poder sobrevivir y como consecuencia de este proceso se reduce o evita la proliferación de patógenos (bacterias, virus, hongos) o por estímulos químicos, debido a la competencia de nutrientes (Cabello *et al.*, 2019).

Antagonismo contra otros microorganismos.

Según Fira *et al.* (2018), varios estudios han demostrado que especies de *Bacillus* actúan como antibacterianos y anti fúngicos contra patógenos en las plantas, mediante la secreción de metabolitos bioactivos como bacteriocinas, policétidos, sideróforos y péptidos (Elanchezhiyan *et al.*, 2018). Los péptidos especialmente lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus* estimulan la defensa natural, los mecanismos inhibición de crecimiento de patógenos y la inmunización del hospedero por resistencia sistémica inducida (ISR) para la eliminación de enfermedades según Ongena, *et al.* (2009), lo cual redundará en una notable reducción de enfermedades y mayor producción (Falconí *et al.*, 2022).

Los lipopéptidos son grandes proteínas sintetizadas no ribosómicamente representadas principalmente por las familias de las surfactinas, iturinas y fengicinas (Yáñez & Falconí, 2018), relacionadas con la patogénesis (PR), que permiten estimular la ISR capacidad propia de *Bacillus*, esta capacidad está relacionada mediante la producción de enzimas de defensa y crecimiento como la

peroxidasa (POD), la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Yáñez & Falconí, 2021).

Biofertilizante.

Las bacterias promotoras de crecimiento del género *Bacillus* poseen un mecanismo de fijación biológica de nitrógeno y la solubilización o mineralización de fósforo permitiendo mejorar la disponibilidad de nutrientes en los cultivos.

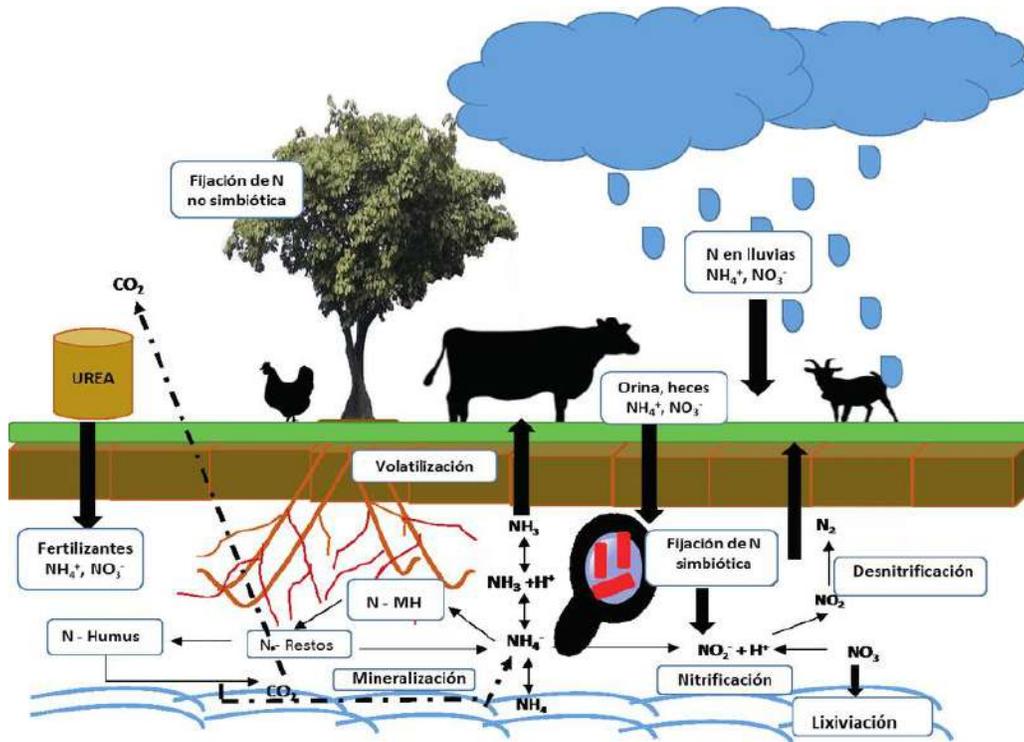
Dinámica del Nitrógeno.

El nitrógeno (N_2), elemento más abundante en la naturaleza, constituyendo el 94% la corteza terrestre y el 6% restante conforma el 99.86 % la atmósfera, y el 0,04% organismos vivos, suelo y agua en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos. Es una molécula casi inerte, debido a su triple enlace entre sus átomos de nitrógeno, evita la asimilación de este elemento por las plantas y algunos microorganismos, los mismos que dependen del nitrógeno en forma inorgánica como iones nitratos (NO_3^{-1}) o de amonio (NH_4^{+1}) disueltos en el suelo, y en los animales, requieren el nitrógeno en forma de aminas, amidas o aminoácidos obtenidos de forma directa o indirecta de las plantas (Corrales *et al.*, 2017).

Por lo tanto, 98% del nitrógeno del suelo al estar combinado con moléculas orgánicas no está disponible para la asimilación de las plantas y entre el 1 y 3% es mineralizado por procesos biológicos como la amonificación y nitrificación, siendo volatilizado el restante de nitrógeno (desnitrificación) como NH_3 , NO y N_2O . El NH_4^{+1} es atraído por las cargas aniónicas y sustancias del suelo como las arcillas y el humus, y el NO_3^{-1} se solubiliza en el suelo y no es atraído por las cargas iónicas, para ser absorbido por las raíces de las plantas como indica en la figura 4 (Corrales *et al.*, 2017).

Figura 4

Ciclo del nitrógeno



Nota. Recuperado de Corrales *et al.* (2017).

Por lo tanto, según Cerón & Aristizábal (2012), la dinámica de este elemento requiere procesos mediados por microorganismos del suelo a excepción de la asimilación como:

- Fijación biológica: conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) asimilable para las plantas por microorganismos (bacterias o cianobacterias) a amoníaco o nitratos, utilizando la enzima nitrogenasa para su descomposición en ausencia de oxígeno, utilizando estrategias para aislarse.
- Nitrificación o mineralización: realizada en dos pasos por diferentes bacterias, primeramente, el amonio es convertido a nitrito mediante bacterias del suelo Nitrosomas y Nitrococcus y segundo, se produce la oxidación de nitrito a nitrato mediante otra bacteria del suelo

Nitrobacter, estos microorganismos dependen de la temperatura del suelo, siendo el proceso más rápido cuando la temperatura está sobre los 10 °C y un pH de 5.5 a 6.5.

- Asimilación: ocurre cuando las plantas absorben nitrato o amonio por medio de sus raíces por medio de la fijación del nitrógeno, incorporándose estas moléculas tanto a las proteínas como a los ácidos nucleicos de las plantas.
- Amonificación: la materia nitrogenada proveniente de los animales como la orina (urea), organismos muertos, entre otros, liberan nitrógeno al medio como NH_3 , permitiendo la integración del nitrógeno al ciclo, mediante la digestión enzimática, convirtiéndose el amonio en compuestos aminados (proteasas, peptonas y aminoácidos)
- Inmovilización: proceso el cual las formas inorgánicas de nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-), son convertidas a nitrógeno orgánico siendo no asimilable.
- Desnitrificación: es llevada a cabo por las bacterias desnitrificadoras, permitiendo la reducción de nitratos (NO_3^-) a nitrógeno gaseoso (N_2), y amonio (NH_4^+) a amoníaco (NH_3), reinvertiendo la acción de las bacterias fijadoras de nitrógeno debido a un alto contenido de materia orgánica, poca disponibilidad de agua y alto pH obligando a los microorganismos a emplear nitrato en vez de oxígeno en su respiración (Centro de información y Comunicación Ambiental de Norte América, 2015).

Nitrogenasas de Bacillus

Bacillus es capaz de fijar nitrógeno que se encuentra en el aire aproximadamente el 78%, mediante la reducción del N_2 atmosférico a amoníaco (proceso de nitrificación), incorporándose en suelo para permitir que las bacterias nitrificantes lo oxiden a nitritos y posteriormente a nitratos, como única forma de nitrógeno de la cual las raíces de las plantas lo asimilan. Este proceso puede ser realizado por dos medios: 1) simbióticos, géneros bacterianos (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, entre

otros), capaces de formar nódulos en la raíz y no considerados PGPR por no ser bacterias de vida libre, y 2) asimbiótica géneros bacterianos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* y *Azospirillum* (Corrales *et al.*, 2017).

La fijación biológica de N_2 es un proceso biológico de algunos organismos procarióticos que poseen la enzima nitrogenasa (Nasa), llamados diazótrofos o consumidores de N_2 (di: dos; azoto: N; trofo: comer) (Aranda, 2014).

Las enzimas son proteínas globulares solubles que se encargan de catalizar reacciones biológicas en los organismos vivos, las mismas que actúan sobre sustratos por medio de interacciones de Vander Waals, electroestáticas e hidrofóbicas o por medio de enlaces covalentes transitorios, reacciones ácido base, reacciones de óxido reducción o reacciones de transferencia, formado complejos enzima- sustrato.

Por lo tanto, las enzimas se las clasifican en función del tipo de reacción que catalizan, como las nitrogenasas que son enzimas que utilizan reacciones de óxido reducción, reduciendo nitrógeno molecular en amoníaco fácilmente asimilable (Herrera *et al.*, 2008).

Según Herrera, *et al.* (2008), existen dos componentes sensibles al oxígeno que regulan el complejo enzimático de las nitrogenasas permitiendo la reducción de N_2 en amoníaco:

- Componente I o nitrogenasa: tetrámero, formado por 2 subunidades de β -proteínas, 2 subunidades de α -proteínas, 24 moléculas de hierro, 2 de molibdeno y un cofactor de hierro (Fe) y molibdeno (Mo) llamado ferromolibdenoproteína (FeMo-Co). la composición metálica de la proteína contiene dos grupos prostéticos distintos: cuatro grupos proteicos (4 Fe-4S), ligados covalentemente a residuos de la cisteína de las subunidades α y β , y dos grupos FeMo-Co unidos a la subunidad α reduciendo N_2 por transporte de electrones, constituyendo el sitio catalítico del N_2 donde se produce la ruptura de su triple enlace.
- Componente II o nitrogenasa- reductasa: es un dímero, formado por 4 átomos de hierro (Fe) unidos con 4 átomos de azufre (S) de determinadas cisteínas denominado ferroproteína,

subunidades idénticas unidas a un grupo prostético 4Fe-4S, requiriendo un complejo de magnesio y energía en forma de ATP para reducir N_2 a NH_3 .

La cisteína es un aminoácido que permite estas reacciones enzimáticas y son la clave para la formación de proteínas estructurales, permitiendo enlazar cisteínas cercanas para logra entrecruzar proteínas, es promotora de grupos de hierro-azufre y participa en la unión de metales. De los 20 aminoácidos comunes los dos únicos que contienen azufre es la metionina y cisteína (Corrales *et al.*, 2017).

La presencia del O_2 permite la regulación de las enzimas nitrogenasas (Nasa), requiriendo la colaboración de otras dos proteínas de ferredoxina y flavodoxina, que actúan como donadores de electrones hacia una molécula del componente I y dos moléculas del componente II para llevar a cabo la reducción de la molécula de N_2 , la reacción está acoplada a la fermentación de azúcares energéticos (fosforilación de ADP) (Aranda, 2014).

Ambos componentes de la nitrogenasa están codificados por un genoma bacteriano llamado *nif*, localizado en el plásmido de las bacterias diazótrofes, permitiendo la síntesis del componente I con los genes *nifD* y *nifK* y para el componente II con el gen *nifH* (Aranda, 2014).

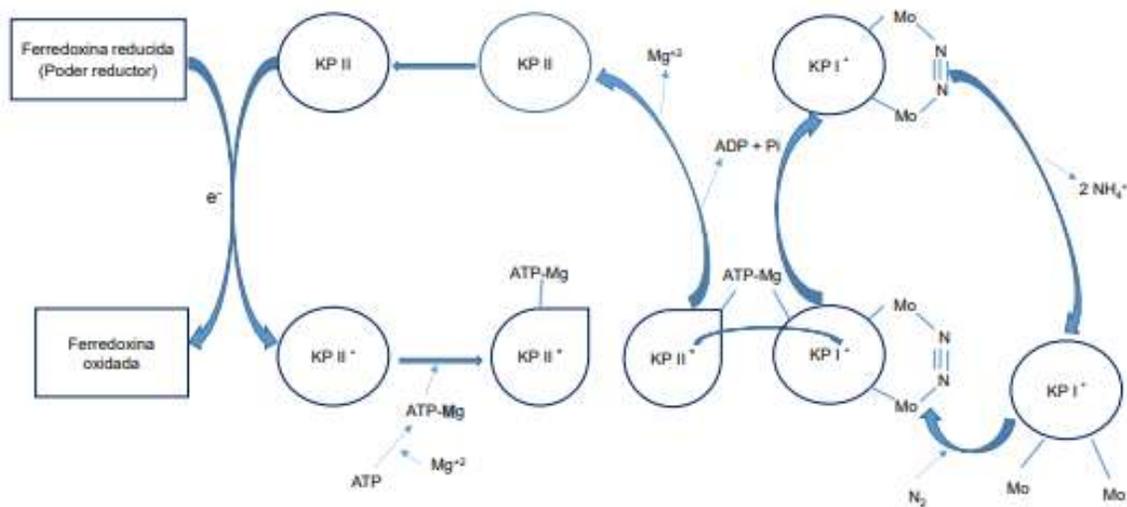
En las bacterias se encuentran una gran cantidad de ferredoxinas que son proteínas con cúmulos de Fe y S, que se diferencian en la secuencia de aminoácidos, función y tipo. Los átomos de hierro y azufre de las ferredoxinas se organizan de tres formas diferentes dependiendo de su organización [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S], de las cuales del tipo [2Fe-2S] son propias de los eucariotes y del tipo [4Fe-4S] y [3Fe-4S] son de tipo bacteriano; y las flavodoxinas en cambio, son proteínas pequeñas que transfieren uno o dos electrones bajo un potencial redox (Carrillo, 2007).

Una característica de los FBN es que permiten brindar cierta cantidad de los H transferidos reduciéndolos por las enzimas nitrogenasas, antes de llegar al N para transformarse en gas (H_2). La cantidad de H_2 formado varía según la cantidad de ATP y el poder reductor que tenga la célula, es decir

baja disponibilidad de ATP mayor de H₂ y con alta disponibilidad aumenta la formación de NH₄⁺ como ilustra en la figura 5 (Herrera *et al.*, 2008).

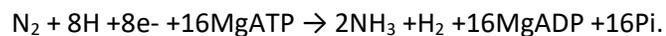
Figura 5

Mecanismo de acción de la nitrogenasa



Nota. Los electrones transferidos desde la ferredoxina sensibles al oxígeno son captados por el KPII, uniéndose el Mg al ATP como forma bioactiva, enlazándose al KPI y provocando la ruptura del triple enlace de N₂ para formar de NH₄⁺. KPI= componente I, KPII= componente II. Recuperado de Herrera *et al.* (2008).

Por esta razón, Camelo *et al.* (2011) menciona que el ajuste estequiométrico de la fórmula de FBN más aceptado se establece con la siguiente ecuación general:



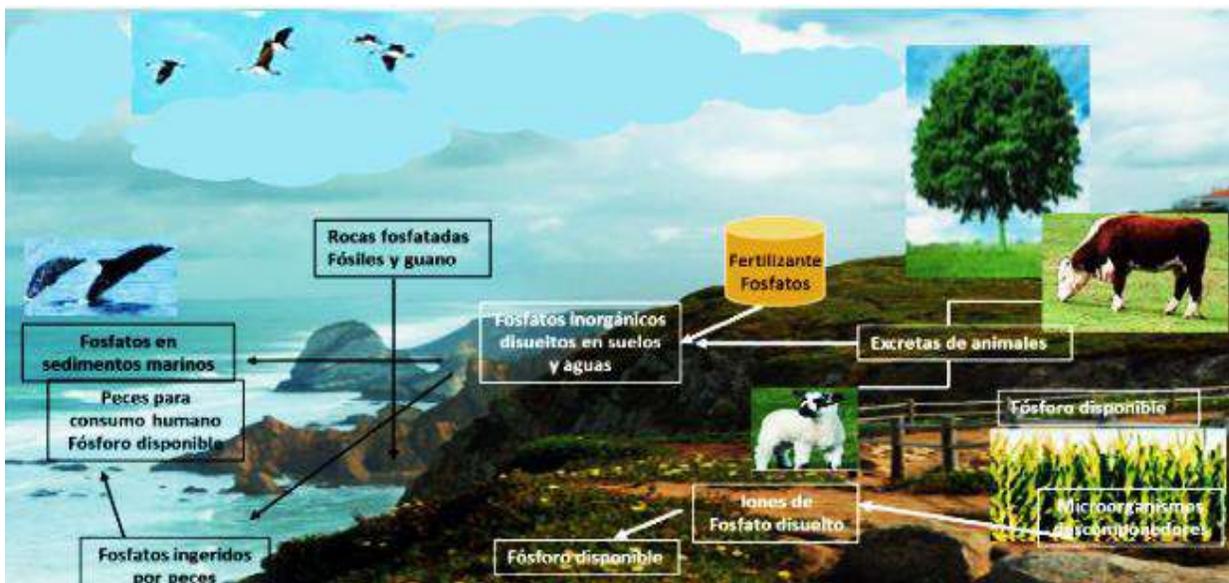
Dinámica del Fósforo

El fósforo (P) es un macronutriente, que participa en el crecimiento de las plantas, en procesos fotosintéticos, transferencia de energía y degradación de carbohidratos. Se encuentra en las plantas en forma inorgánica en pequeñas proporciones y en mayor proporción unido al ácido fítico conteniendo 28% de radicales libres de ácido fosfórico, los mismos que tienen afinidad por diversos cationes como: Fe⁺³> Ca⁺²>Cu⁺>Zn⁺².

La movilidad del fósforo es lenta, permaneciendo por largos periodos de tiempo desde los depósitos de fosfato de la tierra y sedimentos de los mares hasta su disponibilidad para las plantas u organismos vivos, para continuamente regresar a la tierra y el océano, debido a la solubilidad de algunos minerales. El fósforo se vuelve no disponible cuando ocurren las precipitaciones, y por tanto las reacciones son entre el fósforo inorgánico disponible (Pi) y elementos metálicos como Ca, Fe y Al formando sales de fosfato como indica la figura 6 (Corrales *et al.*, 2017).

Figura 6

Ciclo del fósforo



Nota. Recuperado de Corrales *et al.* (2017).

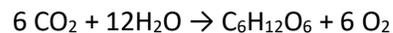
Según Corrales *et al.* (2017), las fuentes de fósforo presentes son: fósforo inorgánico disponible (Pi), fósforo orgánico, fósforo absorbido y fósforo mineral primario.

El fósforo orgánico, se genera a partir de restos de animales y vegetales dando origen a fracciones poco estables y resistentes a la mineralización, y es absorbido en mayor cantidad en suelos arcillosos

El fósforo inorgánico, está constituido por diferentes minerales que liberan fósforo por

mineralización de forma muy lenta debido a que son de menor solubilidad en comparación al fósforo orgánico

El fósforo absorbido por las plantas como ión ortofosfato primario (Fosfato di ácido H_2PO_4^-) o por medio de iones fosfato secundario (fosfato ácido HPO_4^{2-}), lo fija mediante su sistema radicular, distribuyéndose por toda la planta por reacciones químicas, incorporándose a compuestos orgánicos, interviniendo en los procesos fotosintéticos:



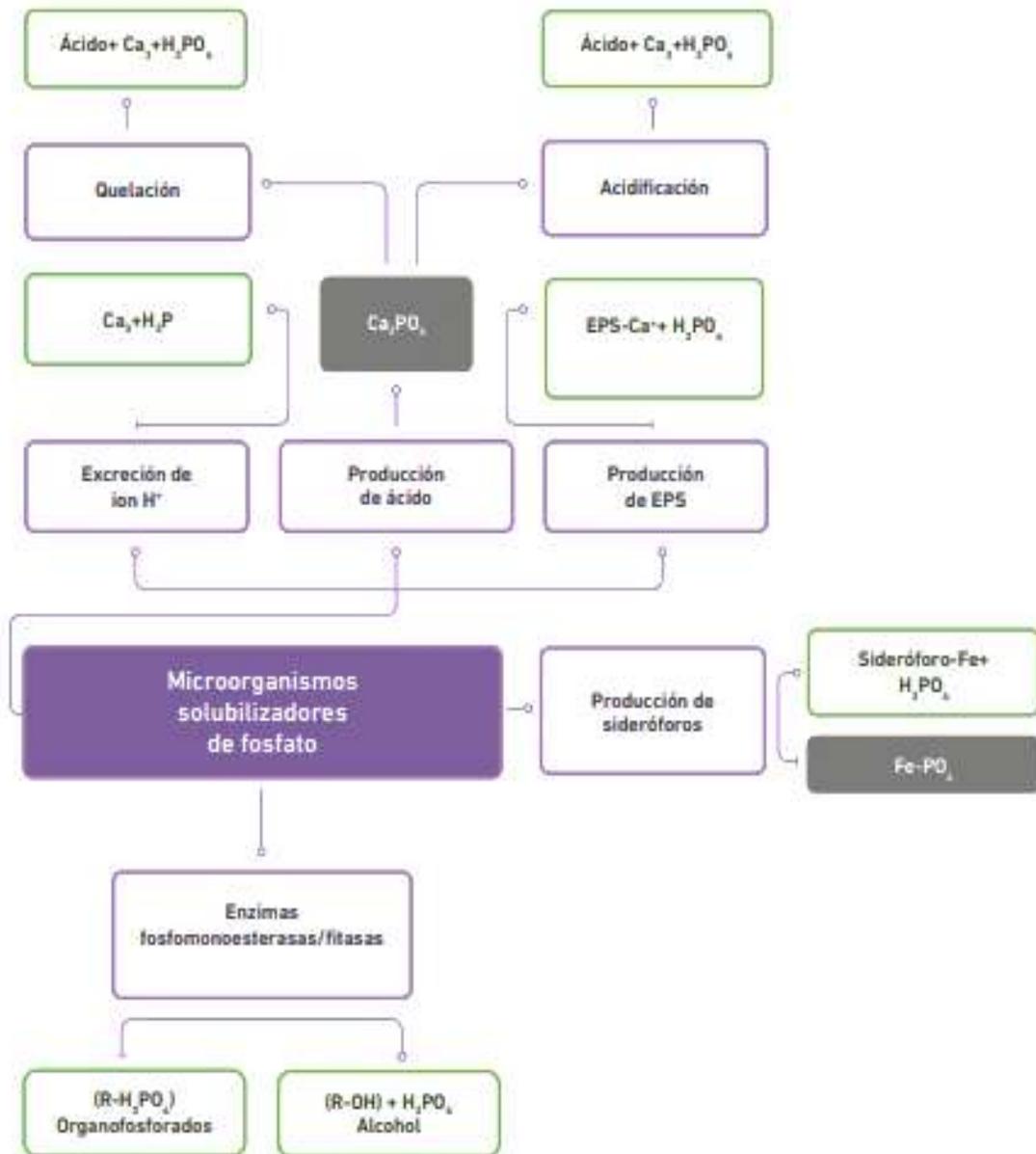
Fosfatasas de Bacillus

Los microorganismos solubilizadores de fósforo (PSM), complementan las necesidades de este elemento en la planta usando mecanismos de liberación de ácidos orgánicos, actuando sobre la acidificación del medio, la quelación, la precipitación y reacciones de óxido- reducción, mediante la absorción por la raíz de las plantas solo en su forma monobásica ($-\text{H}_2\text{PO}_4^-$) o di básica ($-\text{HPO}_4^{2-}$) (Bonilla *et al.*, 2021).

La solubilización de minerales por microorganismos (PSM) se realiza mediante la acción de los ácidos orgánicos y fosfatos solubles añadidos al suelo, que actúan como fertilizantes permitiendo disminuir el pH y conformar complejos estables de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} . La mineralización de fosfatos para su asimilación puede darse de dos formas: 1) mediante ácidos orgánicos presentes en el suelo (ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfonatos, ácido fítico, polifosfonatos y fosfatos de azúcar) que actúan conjuntamente con enzimas microbianas como las fosfomonoesterasas o la fosfohidrolasa (desfosforilan los enlaces fosfoéster o fosfoanhídrido), las fitasas (hidrólisis del ácido fítico o mioinositol fosfato), la fosfonatasa y las C-P liasas (hidrolizan los enlaces éster de los fosfonatos) , y 2) como inorgánicos (ácido sulfúrico, el ácido nítrico y los ácidos carbónicos) permitiendo la liberación de H^+ que se presenta en fosfato inorgánico mediante la asimilación del NH_4^+ (Bonilla *et al.*, 2021).

Figura 7

Mecanismos inorgánicos y orgánicos de solubilización de fosfatos por microorganismos.



Nota. R= Compuesto químico unido al grupo funcional generado en la reacción; EPS= exopolisacáridos. Recuperado de Bonilla *et al.* (2021).

Las fitasas de las bacterias, subfamilia de las fosfatasas se pueden clasificar en dos partes según sus mecanismos catalíticos y la especificidad de hidrólisis: a) fitasas acidas histidinas HAP y b) fitasas alcalinas. El género *Bacillus* produce fitasas alcalinas, presentándose con un pH neutro a básico y a

temperaturas de 70 °C (termo resistente), con capacidad hidrolítica permitiendo remover grupos fosfatos del ácido fítico (mecanismo de reducción), impidiendo quelación de los minerales como el fósforo y trazas de elementos que se encuentran presentes en la biomasa, es decir, que sean insolubles y se produzca su precipitación, convirtiéndose en myo-inositol (ácido fítico), fosfatos y fosfatos orgánicos, radicando la importancia de las bacterias en beneficio a la biodiversidad y la acción frente al ciclo del fósforo brindando solución a la baja disponibilidad de fosfato en los suelos (Corrales *et al.*, 2017).

La enzima fitasa se clasifica como fosfohidrolasa ya que interviene en la hidrólisis del ácido fítico (hexafosfato de inositol) o fitatos requiriendo un intermediario de fosfohistidina para catalizar procesos de desfosforilación de grupos fosfoéster y liberar ortofosfatos libres (6 grupos) por secuencias, mediante procesos bioquímicos, permitiendo la movilización de fósforo inorgánico disponible (Pi) con un pH neutro hacia la planta, generando reservas de fósforo para un desarrollo fisiológico adecuado (Bonilla *et al.*, 2021).

La interacción entre ácido fítico (AF) y cationes (Na^+ , Mg^{+2} , K^+ , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+1+2} y Fe^{+2+3}), permiten la formación de sales myo-inositol hexaquisfosfato (fitatos), donde la solubilidad de las sales y proteínas están relacionadas por el número de protones y formación de complejos a partir de sus cargas eléctricas (iones libres del grupo fosfato). La fitina se forma a partir de las sales de Ca y Mg con el ácido fítico (AF), permitiendo la asociación entre planta –microorganismo (Bonilla *et al.*, 2021).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Ubicación del área de investigación

La presente investigación se desarrolló en dos fases, en el invernadero y en el laboratorio de Fitopatología y Control biológico de la Carrera Agropecuaria IASA I en la Hacienda “El Prado” de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicados en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, bajo las siguientes coordenadas geográficas: 0°, 23', 20" S y 78°, 24', 44" O. Las condiciones ambientales del invernadero de Fitopatología corresponden a una temperatura media anual de 20,04 °C y humedad relativa de 60%, en el laboratorio la temperatura media anual es de 16,3 °C.

Figura 8

Ubicación satelital del sitio de estudio



Nota. A) Invernadero de Fitopatología, B) Laboratorio de Fitopatología. Recuperado de Google Maps (2022).

Instalación del proyecto

Se evaluó la respuesta de 24 plantas de chocho (*L. mutabilis*) por efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en condiciones de invernadero.

Se colocaron cuatro platas de chocho en rizotrones con dimensiones (1.0 m x 0,5 a x 0,4), cada dos plantas fue considerada una unidad experimental, que se adecuó de acuerdo al área de estudio seleccionado.

Sobre las unidades experimentales se distribuyeron en forma aleatoria los tratamientos descritos en la tabla 3.

Tabla 3

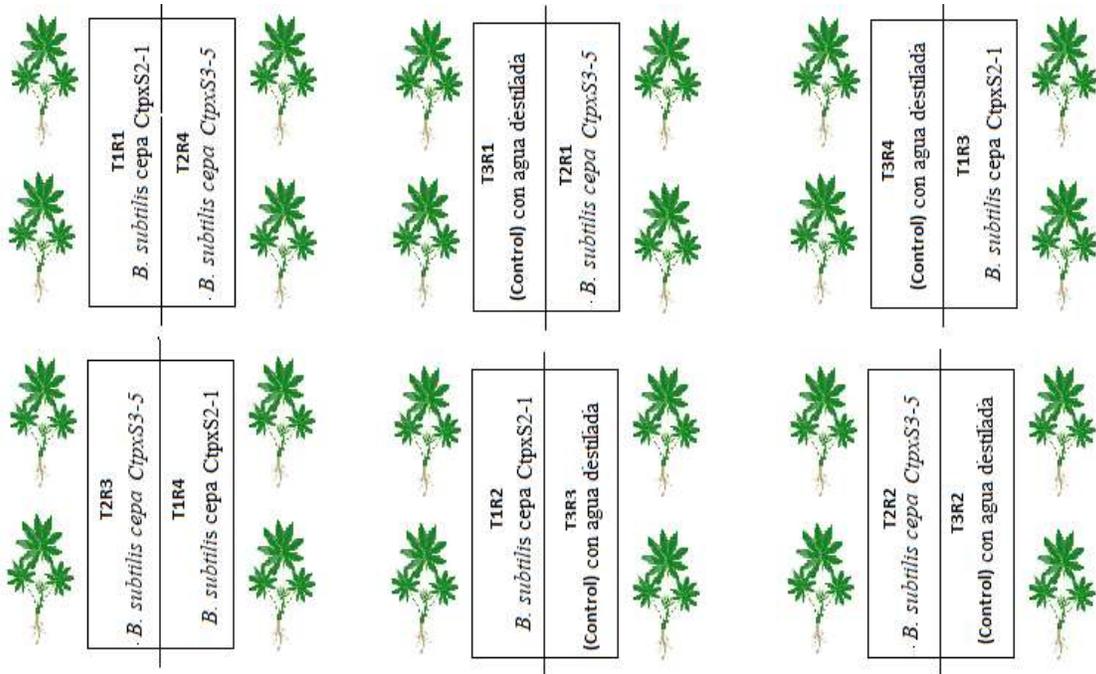
Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Características
T1	Ocho semillas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) inoculadas con <i>B. subtilis</i> cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml)
T2	Ocho semillas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) inoculadas con <i>B. subtilis</i> cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml)
T3 (Testigo)	Ocho semillas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) con agua destilada

El experimento se dispuso bajo un diseño completamente al azar, con tres tratamientos y 4 repeticiones. La disposición del experimento se realizó en rizotrones bajo invernadero como indica la figura 9.

Figura 9

Diseño experimental del ensayo en invernadero



Nota. Autoría propia

Materiales

Insumos

Los insumos que se utilizaron fueron: vasos de precipitación, tubos de ensayo con tapa, cajas de Petri, frascos tarados, matraz Erlenmeyer, probetas, pipetas, micropipetas (puntas amarillas y azules), gradillas, espátula, asas de inoculación, mortero, mechero de alcohol, cloro, 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, reactivo de Salkowski (1 ml de FeCl_3 0.5M, 49 ml de agua y 50 ml de ácido perclórico).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: Medio NYDA (Nutriente broad 8,0 g, extracto de levadura 5,0 g, dextrosa 10,0 g, agar 15,0 g) en 1000 ml de agua (Yáñez *et al.*, 2012) para la conservación, b) medio NYD de referencia y multiplicación bacteriana, sin el componente agar, c) medio ASHBY

MANITOL (Manitol 5g/L, Fosfato di potásico 0.2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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, d) Medio Pikovskaya (Extracto de levadura 0.5 gL⁻¹, Dextrosa 10 gL⁻¹, $CaPO_4$ 5 gL⁻¹, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 gL⁻¹, KCl 0.2 gL⁻¹, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.1 gL⁻¹, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.0001 gL⁻¹, $FeSO_4 \cdot H_2O$ 0.0001 gL⁻¹, Agar 15 gL⁻¹) para identificar la actividad solubilizadora de fosfatos.

Biológicos

Los materiales biológicos utilizados fueron: cepas de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y Ctpx3-5 y semillas de chocho (*L. mutabilis*) var. I-450 Andino, obtenidos del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera Agropecuaria IASA, formulados en medio de bajo coste (Yáñez & Falconí, 2021).

Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos: Cámara de flujo laminar, incubadora, vórtex, balanza digital, autoclave vertical, microscopio, espectrofotómetro, microondas, fluorímetro de clorofila (OPTI-SCIENCES CCM-200 plus).

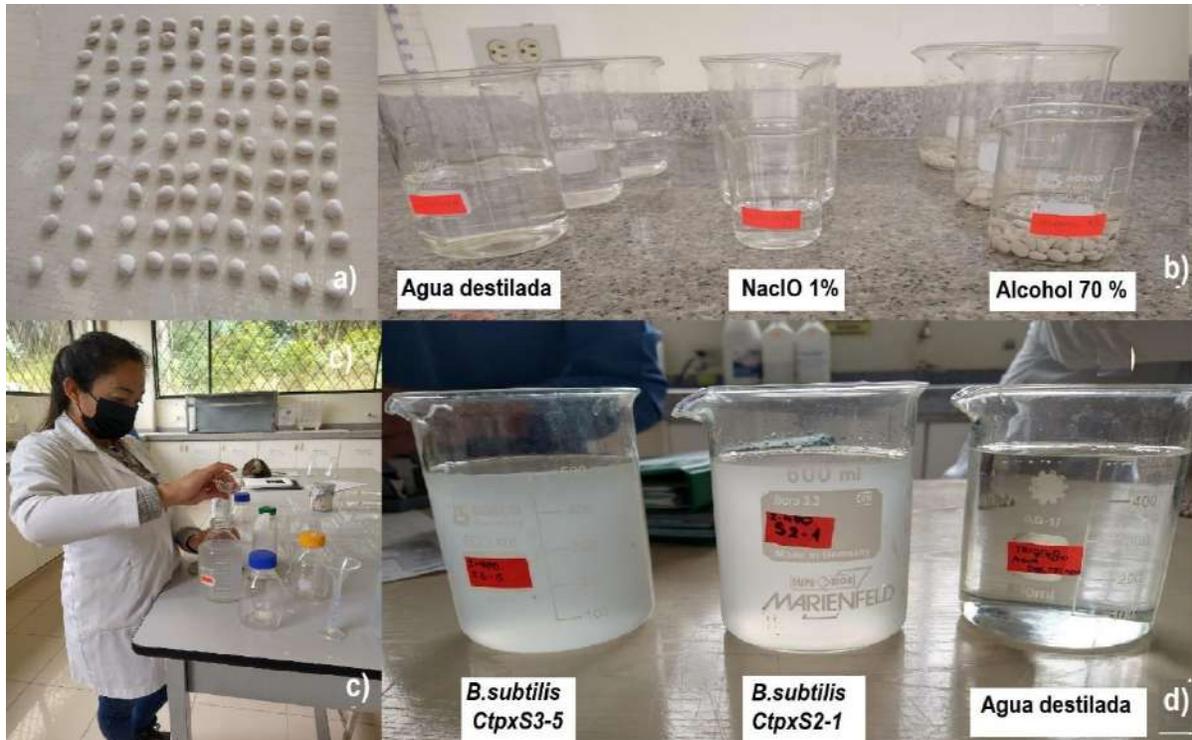
Métodos

Inoculación de B. subtilis CtpxS2 y CtpxS3-5 en semillas de chocho (L. mutabilis)

Las semillas de chocho fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por dos minutos, alcohol al 70% por dos minutos y lavadas con agua estéril (Yáñez *et al.*, 2016), a continuación, se procedió a inocular las semillas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 a una concentración de 1×10^6 (UFC/ml), sumergiendo las semillas durante 15 minutos (Figura 10). Se colocaron las semillas en semilleros plásticos con turba y se dispuso en el invernadero de Fitopatología y Control biológico (IASA), hasta su posterior trasplante en los rizotrones.

Figura 10

Inoculación de B. subtilis CtpxS2 y CtpxS3-5 en semillas de chocho (L. mutabilis)



Nota. a) Selección de semillas de chocho (*L. mutabilis*) var. I-450 Andino, b) desinfección de las semillas de chocho con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, alcohol al 70% y con agua destilada (Yáñez et al., 2016), c) preparación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 a una concentración de 1×10^6 (UFC/ml) d) inoculación de semillas de chocho (*L. mutabilis*). Autoría propia.

Establecimiento de plántulas de chocho (*L. mutabilis*) en el invernadero

En el invernadero de Fitopatología y Control biológico (IASA), se establecieron seis rizotrones (1.0 m de largo x 0,5 m de ancho x 0,5 m de profundidad), que fueron colocados en su interior sustrato con tierra negra, cascarilla de arroz y arena en proporción 1:1:1 (Yáñez et al., 2016), previamente esterilizado bajo solarización y soplete.

Se trasplantó en cada rizotrón, cuatro semillas de chocho previamente germinadas establecidas según el diseño de instalación del proyecto, de tal manera que sus raíces quedaron pegadas al vidrio del rizotrón (Figura 11).

Figura 11

Establecimiento de plántulas de chocho (L. mutabilis) en el invernadero



Nota. a) Esterilización del sustrato bajo solarización y soplete, b) mezcla de sustrato con tierra negra, cascarilla de arroz y arena en proporción 1:1:1, c) Colocación del sustrato en cada rizotrón, d) disposición de los rizotrones con un diseño completamente al azar e) selección de semillas germinadas considerando su tamaño de radícula, f) siembra de semillas de chocho previamente germinadas en los rizotrones. Autoría propia.

Inoculación de Bacillus subtilis CtpxS2 y CtpxS3-5 en plántulas de chocho (L. mutabilis)

La inoculación de *B. subtilis CtpxS2* y *CtpxS3-5* a una concentración de 1×10^6 (UFC/ml) en plántulas se realizó cada 15 días, durante tres meses en la base del tallo de cada planta de chocho a razón de 300 ml por planta, de forma paralela, y a su vez se realizó la dinámica poblacional de la rizósfera antes de cada aplicación (Falconí *et al.*, 2022).

Variables evaluadas

Variables agronómicas

Altura de la planta.

La altura de la planta fue medida 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.

Área de raíces.

El área de raíces se determinó mediante fotografías digitales del software Digital imaging of root traits (DIRT) para obtener rasgos fenotípicos como la longitud, forma y diámetro de las raíces.

Dinámica poblacional de Bacillus subtilis

Para evaluar la dinámica poblacional, se obtuvo una muestra de 10 g de suelo de la rizósfera inoculada por tratamiento y repetición, se colocó cada muestra en vasos de precipitación previamente rotulados para ser llevados a baño maría a una temperatura de 80 °C por 20 minutos, al culminar el tiempo se llevó a la cámara de flujo laminar las muestras donde se colocaron 90 ml de agua destilada (dilución 1: 10) para evaluar la supervivencia de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en la filósfera de la planta de chocho, mediante el método de dilución y plateo (Falconí *et al.*, 2022), hasta la dilución 10⁻⁴ (Figura 12).

Se tomaron 50 ul de las diluciones 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ por tratamiento y repetición, se sembraron en placas Petri por triplicado en medio NYDA. Las muestras se incubaron a 28°C ±2 por 24 horas para contar colonias bacterianas, las mismas que fueron estimadas como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (CFU/g) mediante la siguiente fórmula:

$$UFC/g = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volúmen de la sln sembrada}}$$

Figura 12

Dinámica poblacional de Bacillus subtilis



Nota. a) Recolección de la rizósfera inoculada por tratamiento y repetición, b) pesaje de 10 g de cada muestra de suelo, c) colocación de muestras del suelo a baño maría a 80 °C, d) preparación de material en la cámara de flujo laminar, e) adición de 90 ml de agua destilada (dilución 1: 10) en cada muestra de suelo, f) colocación de cada dilución en el agitador orbital durante 20 minutos, g) elaboración de bancos de dilución y método de dilución y plating hasta la dilución 10^{-4} y siembra en medio NYDA, h) incubación a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas de cada muestra. Autoría propia.

Variables fisiológicas

Fijación de nitrógeno atmosférico

A partir de las dos cepas de *B. subtilis* CtpxS-1 y CtpxS3-5 y las colonias obtenidas del sustrato de cada tratamiento, conjuntamente con su control negativo *Pseudomonas* sp. (bacterias libres de nitrógeno), se realizaron diluciones sucesivas hasta la 10^{-3} , las cuales se sembraron en el medio ASHBY medio sólido libre de nitrógeno (Manitol 20.0 g/l, K_2HPO_4 0.2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l, NaCl 0.2 g/l, KSO_2 0.1 g/l, CaCO_3 5.0 g/l, y agar 17.0 g/l), por dispersión utilizando espátulas de Drigalsky, luego las cajas petri se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 5 días hasta observar colonias (Pilatuña, 2018).

Para verificar la pureza de las colonias se realizaron réplicas sucesivas en placa con medio Ashby y se las preservó en medio NYDA a 4 °C (Pilatuña, 2018).

Para cuantificar el nitrógeno en planta por espectrofotometría, se procedió con la preparación de la solución madre a partir de la colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, las mismas que se colocaron en tubos Falcon de 5 ml que se introdujeron en el nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo delgado. Se colectó 1 g de las hojas liofilizadas y se colocó en un tubo Eppendorf de fondo cónico de 2 ml añadiendo 1 ml de PBS, para ser triturado con un micro pistilo y aforado a 2 ml con PBS, posteriormente se homogenizaron en el vórtex durante dos minutos conservando la cadena de frío y se centrifugó para separar el sobrenadante por 20 minutos a 14000 RPM (Figura 13) (Chávez, 2018).

Al culminar los 20 minutos en la centrifuga, se extrajo 500 ul del sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf con 1000 ul de PBS (relación 1:2), para centrifugar por segunda vez, finalizando el proceso se colocaron los tubos en la crio congeladora a 80°C, para proceder a preparar el reactivo de trabajo y la microplaca (Figura13) (Chávez, 2018).

Para el análisis se procedió de forma estricta como lo indica el protocolo del kit, conjuntamente con la preparación del reactivo de trabajo (WR) utilizando la siguiente fórmula:

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

$$(25 \text{ muestras}) \times (2 \text{ réplicas}) \times (200\text{ul}) = 10000 \text{ Reactivo de trabajo}$$

Se preparó el reactivo de trabajo, mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B, es decir:

$$\frac{10000 \text{ partes del reactivo de trabajo} \times 50 \text{ partes de A}}{51 \text{ partes del reactivo de trabajo}} = 9804 \text{ ul partes de A (Ecuación 1)}$$

10000 partes del reactivo de trabajo – 9804 partes de A = 196 ul partes de (Ecuación 2)

Por lo tanto, se preparó el reactivo de trabajo mezclando 9804 ul del reactivo A (Ecuación 1) y 196 ul del reactivo B (Ecuación 2).

Para preparar la microplaca, se colocó 25 ul de la solución madre por duplicado en cada pocillo, que se conservaron en el crio congelador para mantener la cadena de frio y 200 ul del reactivo de trabajo previamente preparado, se cubrió la microplaca y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se colocó en el espectrofotómetro ajustando la onda a 540-590 nm para realizar la medición y obtener la curva de calibración indicada en la Tabla 4.

Tabla4

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

Nota. Recuperado de Chávez (2018).

Figura 13

Cuantificación de nitrógeno en hojas frescas de *L. mutabilis*



Nota. a) Colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, b) muestras de hojas colocadas en nitrógeno líquido, hasta obtención de un polvo delgado, c) peso de 1 g de las hojas liofilizadas aforadas a 2 ml con PBS en tubos eppendorf y maceradas con micropistilo, d) centrifugación de cada muestra durante 20 minutos a 14000 RPM, e) extracción de 500 µl del sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf con 1000 µl de PBS (relación 1:2), f) preparación de la microplaca con 25 µl de la solución madre por duplicado en cada pocillo y 200 µl del reactivo de trabajo, g) incubación a 37°C durante 30 min de la microplaca, h) Lectura en el espectrofotómetro ajustando la onda a 540-590 nm. Autoría propia.

Índice de contenido de clorofila.

Se realizó la cuantificación del índice de clorofila cada 7 días en 3 folíolos de las hojas de las plantas de chocho, mediante el Fluorímetro de clorofila CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Science).

Para la cuantificación de clorofila en planta se colectaron hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, cortándolas en tiras delgadas hasta obtener 0,5 gr de cada muestra, para posteriormente colocarlas en tubos de ensayo previamente rotulados y forrados de papel aluminio para

evitar el contacto de las muestras con la luz, adicionando 5 ml de etanol 96%, macerando cada muestra con una varilla de vidrio, se tapó cada tubo y se llevó a refrigeración a una temperatura de -4°C durante 24 horas (Yépez, 2018).

Posteriormente se colocó la muestra en tubos Falcon para centrifugar a 2000 RPM por 10 minutos. Se extrajo 1 ml del sobrenadante de cada muestra y se aforó a 6 ml con etanol al 96%. Se colocó 1500 μl de la muestra en las celdas de 10 nm para la medición en el espectrofotómetro ajustando la onda a 645 y 663 nm (Yépez, 2018).

Figura 14

Medición del índice de clorofila en hojas colectadas de L. mutabilis



Nota. a) colecta de hojas de *L. mutabilis*, b) corte en tiras delgadas hasta obtener 0,5 gr de cada muestra de hojas, c) adición de 5 ml de etanol 96% en tubos de ensayo con los 0,5 g de muestra de hojas pesadas, d) maceración de las muestras, e) refrigeración a -4°C durante 24 horas cada muestra, f) centrifugación a 2000 RPM por 10 minutos, g) extracción de 1 ml del sobrenadante de cada muestra y se aforó a 6 ml con etanol al 96% h) medición en el espectrofotómetro ajustando la onda a 645 y 663 nm. Autoría Propia.

Sólidos solubles totales.

Se procedió a preparar la solución madre a partir de la colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, las mismas que se colocaron en tubos Falcon de 5 ml que se introdujeron en el nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo delgado. Se colectó 1 g de las hojas liofilizadas y se colocó en un tubo Eppendorf de fondo cónico de 2 ml añadiendo 1 ml de PBS, para ser triturado con un micro pistilo y aforado a 2 ml con PBS, posteriormente se homogenizaron en el vórtex durante dos minutos conservando la cadena de frío y se centrifugó para separar el sobrenadante por 20 minutos a 14000 RPM.

Al culminar los 20 minutos en la centrifuga, se extrajo 500 ul del sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf con 1000 ul de PBS (relación 1:2), para centrifugar por segunda vez, finalizando el proceso se colocaron los tubos en la crio congeladora. En el día se pesaron nuevos tubos Eppendorf de 0,5 ml en la balanza analítica y se obtuvo el peso inicial (P_o), posteriormente se colocó 100 ul de las muestras y se colocó en la estufa en un recipiente de vidrio totalmente sellado añadiendo sílica gel en la base para que absorba la humedad del medio, durante 24 horas para volver a pesar y obtener el peso final (P_f).

Figura 15

Cuantificación de sólidos solubles totales



Nota. a) Colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, b) muestras de hojas colocadas en nitrógeno líquido, hasta obtención de un polvo delgado, c) peso de 1 g de las hojas liofilizadas aforadas a 2 ml con PBS en tubos eppendorf y maceradas con micropistilo, d) centrifugación de cada muestra durante 20 minutos a 14000 RPM, e) extracción de 500 µl del sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf con 1000 µl de PBS (relación 1:2), f) peso nuevos tubos Eppendorf de 0,5 ml y se obtuvo el peso inicial (Po), g) colocación de 100 µl del sobrenadante, h) y i) colocación en la estufa en un recipiente de vidrio totalmente sellado y con sílica gel en la durante 24 horas para volver a pesar, j) obtención del peso final (Pf). Autoría propia

Solubilización de fosfatos

A partir de las dos cepas de *B. subtilis* *CtpxS-1* y *CtpxS3-5* y las colonias obtenidas del sustrato de cada tratamiento, se realizaron diluciones sucesivas hasta la 10^{-3} , las cuales se sembraron en el medio Pikovskaya (Extracto de levadura 0.5 gL⁻¹, Dextrosa 10 gL⁻¹, CaSO₄ 5 gL⁻¹, (NH₄)₂ SO₄ 0.5 gL⁻¹, KCl 0.2 gL⁻¹, MgSO₄ .H₂ O 0.1 gL⁻¹, MnSO₄ .H₂ O 0.0001 gL⁻¹, FeSO₄ .H₂ O 0.0001 gL⁻¹, Agar 15 gL⁻¹), posteriormente se incubaron a 28°C ±2 por 4 días hasta observar colonias rodeadas de halo de color transparente. Se consideró positivo al evidenciar el viraje de color por efecto de la solubilización de

fosfato (Romero *et al.*, 2019).

Detección y cuantificación de auxinas

La detección y cuantificación de auxinas se llevó a cabo empleando el reactivo de Salkowski (H₂SO₄ Concentrado 15ml, Agua destilada 25ml y 0,75 ml FeCl₃.6H₂O 0.5M) (Diaz, 2018), permitiendo determinar la presencia de grupos indol propios de los compuestos auxínicos.

Para determinar la cantidad en gramos de FeCl₃.6H₂O 0.5M, en una solución de 10 ml (0,01lt) se realizó el siguiente cálculo:

$$M = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{volumen de la sln (lt)}}$$

$$0,5 \text{ M FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = \frac{\text{moles de soluto}}{0,01 \text{ lt}}$$

$$0,5 \text{ M FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \times 0,01 \text{ lt soln} = \text{moles de soluto}$$

$$0,005 \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = \text{moles de soluto}$$

El peso molecular de FeCl₃ .6 H₂O= 270,3 gr/mol por tanto:

$$0,005 \text{ mol FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \frac{270,3 \text{ gr}}{1 \text{ mol}} =$$

$$1.3515 \text{ gr de FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ por cada 10 ml de solución (Ecuación 3)}$$

Es decir, para preparar 10 ml de solución de FeCl₃ .6 H₂O se añadió 1,3515 g de FeCl₃ .6 H₂O como se requirió preparar una solución de 80 ml del reactivo de Salkowski, debido al requerimiento de 1,5 ml para cada muestra (24 plantas por duplicado); por tanto, se preparó el reactivo con 30 ml de H₂SO₄ concentrado, 50 ml de agua destilada y 1,5 ml FeCl₃.6H₂O 0.5M de los 10 ml preparados (Ecuación 3).

A continuación, se preparó una solución madre de 5 mg/5ml de acetona al 80% para realizar soluciones patrón con concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 µg/ml por triplicado (Tabla 5) y

generar la oxidación de las moléculas de indol mediante el ácido perclórico permitiendo una coloración rosada a fucsia. Utilizando las soluciones patrón, se construyó una curva de calibración de ácido indol acético (AIA) midiendo la absorbancia a 530 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS y posteriormente se halló el coeficiente de correlación aceptable de las auxinas de R2 entre 0,97 a 1 (Díaz, 2018).

Tabla 5

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. Recuperado de Intriago (2021).

Para el análisis en planta de ácido indol acético (AIA), se tomaron muestras de raíz previamente lavadas con agua destilada por tratamiento, evitando la exposición a la luz, se colocaron las raíces en tubos Falcon previamente rotulados y envueltos con papel aluminio y se añadió acetona al 80% hasta cubrir totalmente las raíces, se dejó reposar a -4°C durante 5 días, tapando los tubos correctamente, para evitar la degradación del AIA. A continuación, se pesó un gramo de raíz, se maceró finamente y se filtró, posteriormente se recolectó 500 ul de cada muestra filtrada en tubos de ensayo (envueltos de papel aluminio) y se añadió 1,5 ml de reactivo de Salkowski, se dejó reposar durante 30 minutos sin exponer las muestras a la luz y tapando correctamente los tubos. Se homogenizó las muestras con vortex a 500 RPM durante dos minutos, y se colocó 1500 ul en cada celda por muestra y por duplicado para ser

llevados al espectrofotómetro para evaluar (AIA) (Figura 17) (Intriago, 2021).

Figura 16

Detección y cuantificación de auxinas en raíces de L. mutabilis



Nota. a) y b) Toma de muestras de raíz y peso de 1 g de cada muestra, c) colocación las raíces en tubos Falcon envueltos con papel aluminio y acetona al 80% hasta cubrir totalmente las raíces, d) reposo de las muestras a -4°C durante 5 días, e) y f) maceración y filtración de las muestras de raíz, g) recolecta de 500 ul de cada muestra filtrada en tubos de ensayo y adición de 1,5 ml de reactivo de Salkowski, se dejó reposar durante 30 minutos, se homogenizó con vortex, h) se colocó 1500 ul en cada celda por muestra y por duplicado para ser llevados al espectrofotómetro para evaluar (AIA). Autoría propia.

Análisis de información

El experimento se dispuso bajo un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones, 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

La disposición del experimento en el invernadero se puede apreciar en la figura 9.

Las variables de respuesta se analizaron mediante estadística descriptiva (media y desviación estándar). Para comparar el efecto de las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 sobre las variables mencionadas se realizó un análisis de varianza ANOVA y pruebas de comparación de Tukey al 5%. Todos los análisis serán realizados en el software estadístico INFOSTAT.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

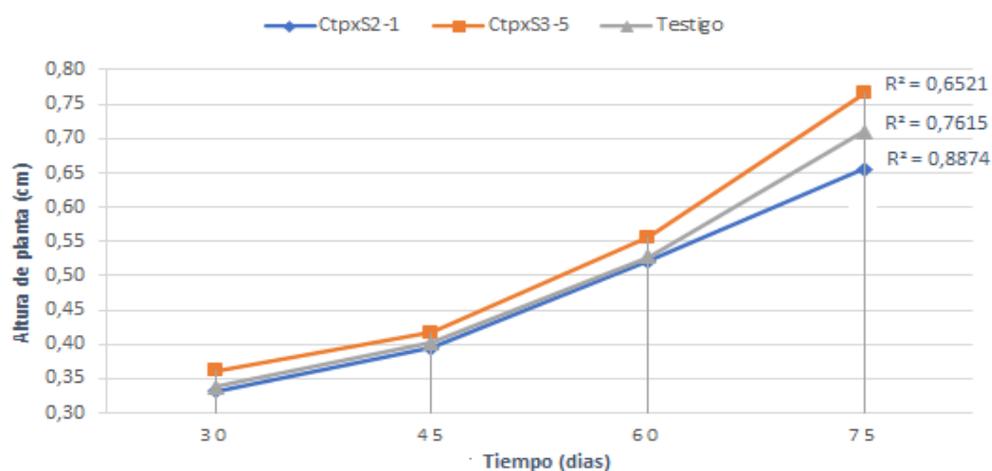
Variables agronómicas

Altura de la planta

Las medias de la altura de plantas tratadas con inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml) y testigo (agua destilada), durante el período de tres meses, no presentaron diferencias significativas.

Figura 17

Altura de las plantas de chocho (cm) durante tres meses de aplicación, a partir de la formación de plántulas (30 días)



Nota. Variación de las alturas en plantas de chocho cada 15 días. Autoría propia

Sin embargo, se puede evidenciar que las inoculaciones sucesivas de *B. subtilis* CtpxS2-1 indujeron el crecimiento a lo largo de los tres meses. Mediante inoculaciones sucesivas con la cepa CtpxS3-5 se logró un mayor incremento en la altura, en comparación con el testigo (Figura 17).

De acuerdo a lo indicado, mediante inoculaciones periódicas con las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5 a partir del día 30 hasta los 75 días, se logró respuestas positivas del 88% y el 65% respectivamente en relación a la altura de planta (Figura 17).

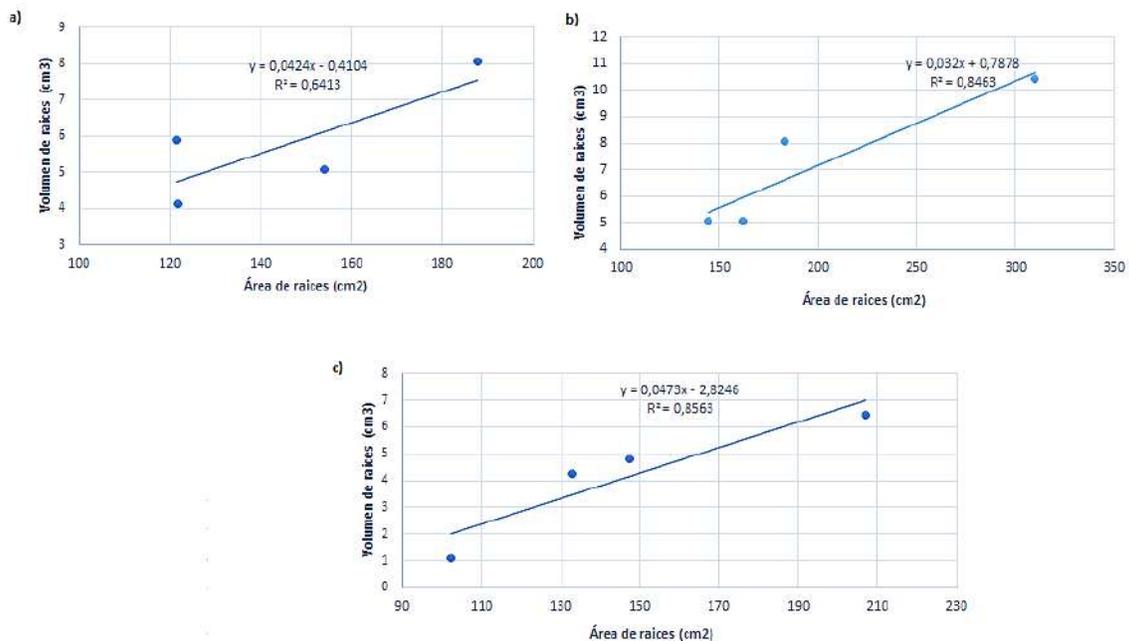
Área de raíces

Las medias del área de las raíces de chocho, tratadas con *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se obtuvo modelos de regresión lineal entre el promedio del área (cm²) y el volumen (cm³), de las raíces de las plantas de chocho tratadas con *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 (Figura 18a) y Ctpx3-5 (Figura 18b), las mismas que muestran una correlación altamente significativa entre estas variables, lo que sugiere que, a medida que aumenta el área de raíces también, aumenta el volumen de las raíces.

Por lo tanto, las raíces de las plantas de chocho tratadas con inoculaciones periódicas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 muestran respuestas numéricamente positivas del 64% y el 84% respectivamente entre el área (cm²) y el volumen (cm³), sin embargo, el testigo obtuvo valores numéricamente menores para la correlación entre el área y volumen (Figura 18c), que las raíces tratadas con *B. subtilis*.

Figura 18

Correlación entre el área y volumen de raíces de chocho tratadas con *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 y CtpxS3-5



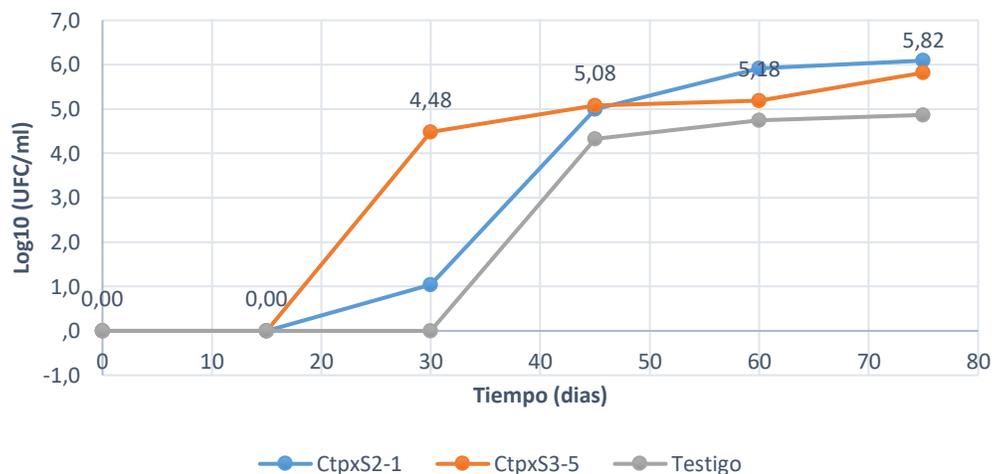
Nota. a) Correlación entre el área y volumen de *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), b) Correlación entre el área y volumen de *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), c) Correlación entre el área y volumen del Testigo (agua destilada). Autoría propia

Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

Se evaluó la dinámica poblacional a partir de muestras de rizósfera inoculadas con *B. subtilis* por tratamiento y repetición cada 15 días de la inoculación. Los resultados indican que el tratamiento inoculado con *B. subtilis* Ctpx2-1 tuvo mayor número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de rizósfera recolectado (UFC/g). Por lo tanto, se evidencia que *B. subtilis* en la rizósfera de las plantas de chocho, la cepa CtpxS2-1 presentó un inicio de estabilidad alrededor de 5,82 log₁₀ (UFC/g) y 6,09 log₁₀ (UFC/g) de la cepa CtpxS3-5 a lo largo de tres meses de inoculaciones. (Figura 19).

Figura 19

Dinámica poblacional de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5, en la rizósfera de plantas de chocho a lo largo de tres meses.



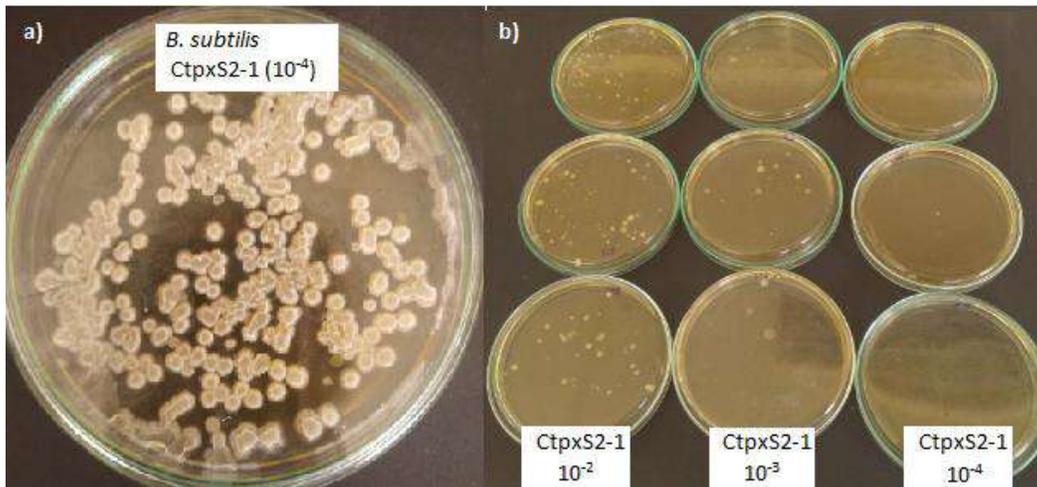
Nota. a) Población de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1, CtpxS3-5 y testigo, recuperados de la rizósfera de los cultivares de chocho. Para mejorar la homogeneidad de las varianzas, los datos de concentración bacteriana se transformaron a Log₁₀ (UFC/g), cada punto representa la media ± DE, de seis inoculaciones realizadas cada 15 días. Autoría propia.

Adicionalmente, a partir del método de dilución y siembra en placa (medio NYDA), realizado con muestras de rizósfera inoculada con *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml) y *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml) cada 15 días, la cepa CtpxS2-1 presentó mayor crecimiento progresivo comparado con el

testigo, producto de diluciones sucesivas desde 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} por triplicado (Figura 20).

Figura 20

Dilución y plating de *B. subtilis* CtpxS2-1 (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} UFC/ml) colectado de la rizósfera de chocho y crecido en medio NYDA



Nota. a) *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^{-4} UFC/ml), medio NYDA, b) Diluciones sucesivas de *B. subtilis* CtpxS2-1 (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) por triplicado en medio NYDA, incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas. Autoría propia.

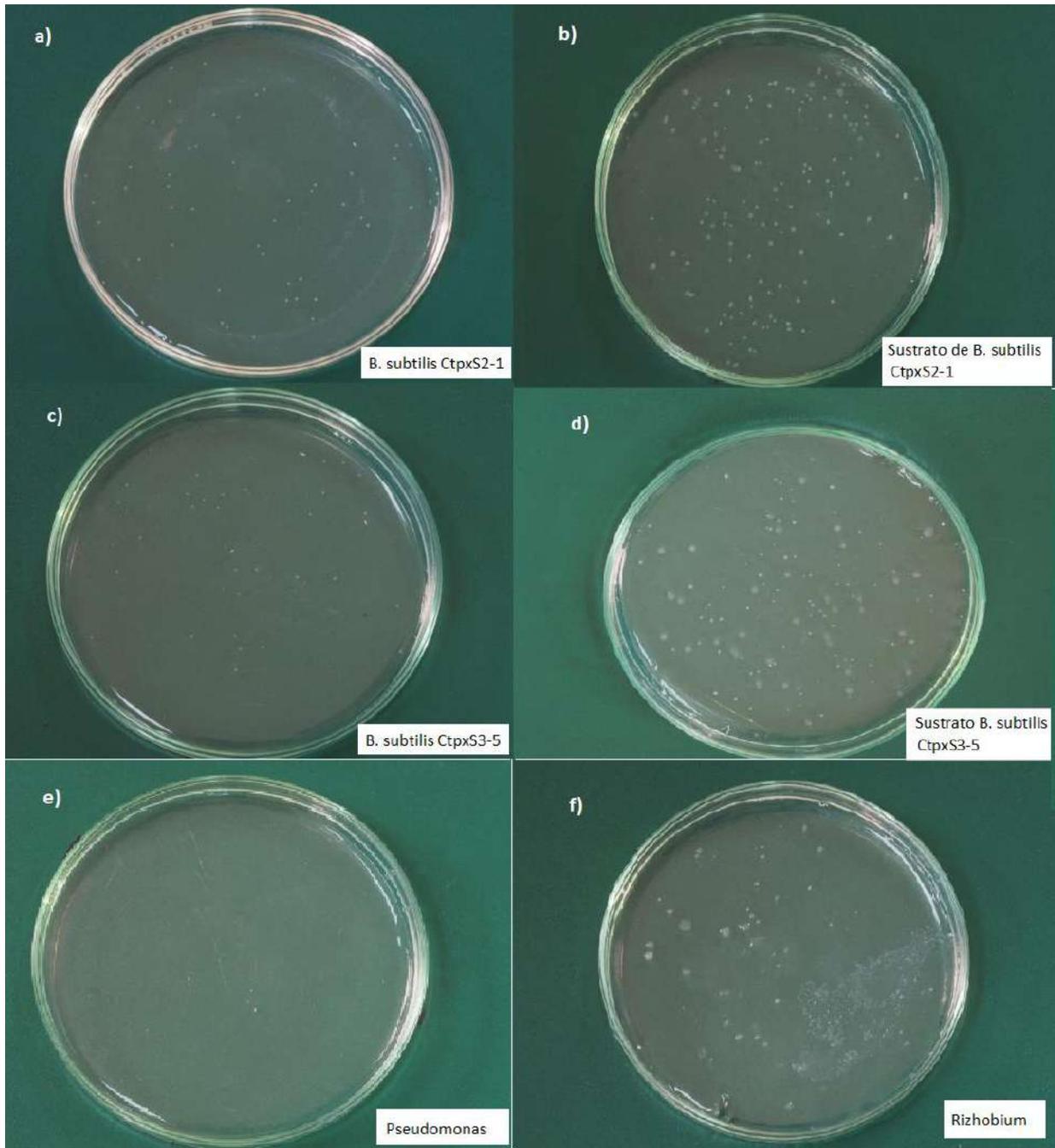
Variables fisiológicas

Fijación de nitrógeno atmosférico

Los resultados obtenidos a partir de las dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 (Figura 20a,c) y las colonias obtenidas del sustrato inoculado de cada tratamiento (Figura 20b,d), evidencian el crecimiento de *B. subtilis* en el medio libre de nitrógeno (Ashby manitol), al igual se puede verificar que en el testigo existe crecimiento de bacterias en este caso *Rizhobium* (control), bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno propia de plantas de chocho; dado esto se evidencia también, su control negativo *Pseudomonas sp.* (bacteria libre de nitrógeno) (Figura 20e), realizando diluciones sucesivas hasta la 10^{-3} , las cuales se sembraron en el medio ASHBY (medio sólido libre de nitrógeno).

Figura 21

Inoculaciones en medio Ashby Manitol de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml).

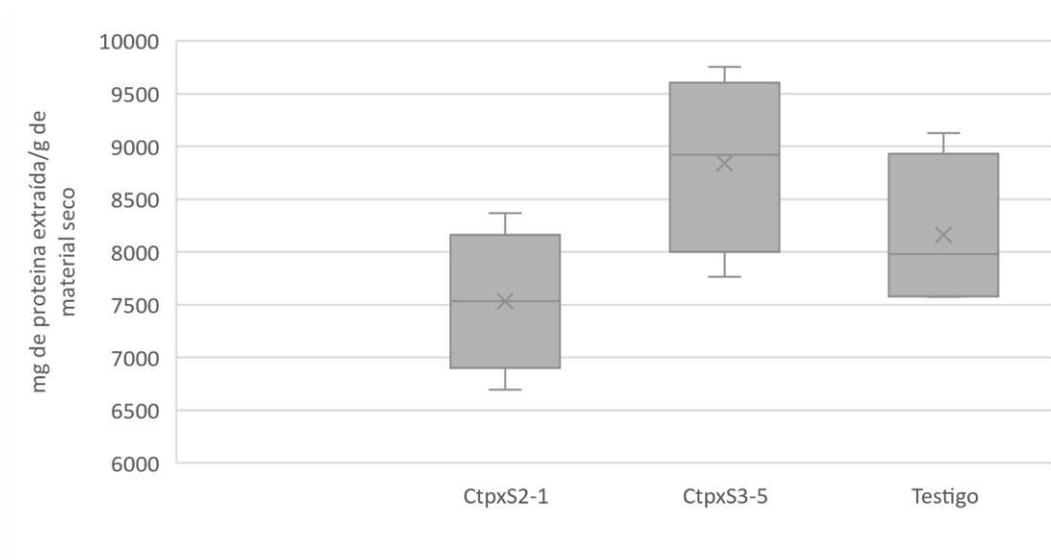


Nota. a) *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol b) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS2-1(1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol c) *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol, d) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol, e) *Pseudomonas* sp. 1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol f) *Rizhobium* 1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol. Autoría propia

Respecto al contenido de proteína, obtenido a partir de la colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se obtuvo promedios mayores en el contenido proteico en el tratamiento inoculado con *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 de 8842,05 mg de proteína extraída/g de material seco, a comparación del tratamiento *B. subtilis* CtpxS2-1 con 7532,77 mg/g (Figura 22).

Figura 22

Representación de los promedios y límites superiores e inferiores del contenido proteico por cada gramo de material seco en hojas de *L. mutabilis* producto de inoculaciones con *B. subtilis*.



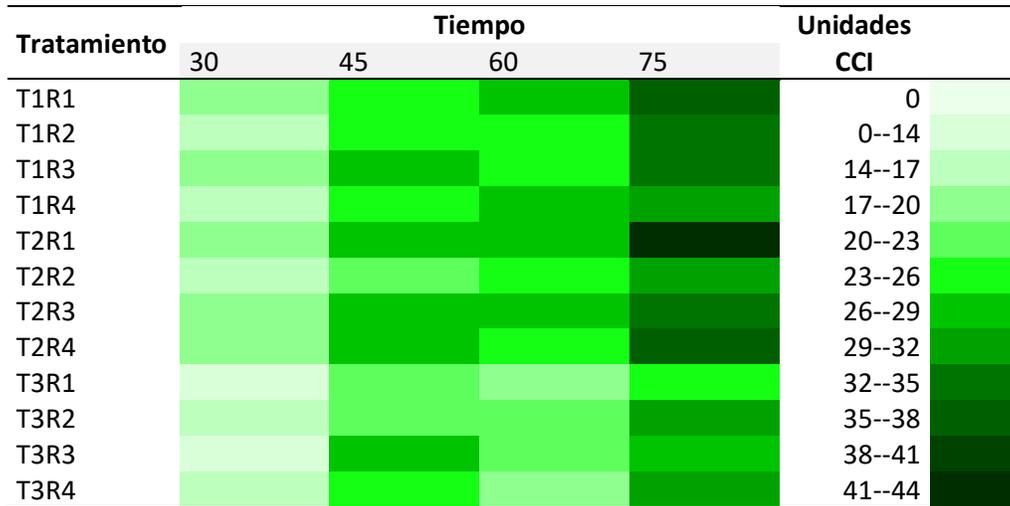
Nota. Inoculaciones de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3 testigo (agua destilada). Autoría propia.

Índice de contenido de clorofila.

Con relación al índice de clorofila los resultados obtenidos mediante el Fluorímetro CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Science), tomados cada 15 días en 3 folíolos de las hojas de las plantas de chocho, no presentaron diferencias significativas, pero se obtuvo una mayor tendencia al incremento en el contenido de clorofila con *B. subtilis* de la cepa Ctpx3-5, con valores que fluctúan entre 26 a 44 unidades de CCI como indica la figura 23.

Figura 23

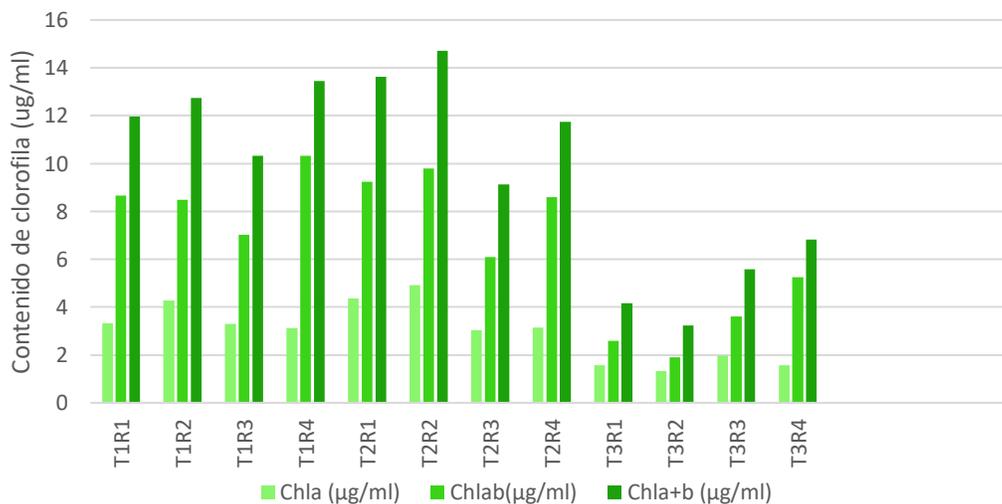
Efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1, Ctpx3-5 y testigo en hojas de *L. mutabilis*



Nota. T1 con cuatro repeticiones: *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), T2 con cuatro repeticiones (*B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3 con cuatro repeticiones (agua destilada). Autoría propia.

Figura 24

Efecto de inoculaciones periódicas de dos cepas de *B. subtilis* en clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y clorofila total (Chla+b) en hojas de *L. mutabilis*



Nota. T1 con cuatro repeticiones: *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), T2 con cuatro repeticiones: *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3 con cuatro repeticiones: testigo (agua destilada). Autoría propia.

Adicionalmente, se realizó la extracción de clorofila (Chla, Chlb y Chla+b), mediante métodos bioquímicos, los cuales presentaron diferencias significativas, para cada tratamiento y repetición ($F_{4,25}=6,94$; $P < 0,0150$) (Tabla 6).

El contenido de Chla+b en el tratamiento con *B. subtilis* Ctpx2-1, y con *B. subtilis* Ctpx3-5, presentaron mayor contenido 12,12 ug/ml y 12,48 ug/ml respectivamente, comparado con el tratamiento testigo con un promedio de 6,31 ug/ml (Figura 24).

Tabla 6

Promedio \pm desviación estándar del contenido de clorofila total (Chla+b), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.

Tratamiento	Chla+b	
Ctpx2-1	12,12 \pm 1,34	A
Ctpx3-5	12,48 \pm 2,96	A
Testigo	6,31 \pm 3,34	B

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

Sólidos solubles totales.

Las medias de los datos obtenidos de sólidos solubles totales de hojas de *L. mutabilis* tratadas con inoculaciones periódicas en la rizósfera de *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml) ($F_{4,256}=6,47$ $P=0,0182$), presentaron diferencias significativas.

El tratamiento de la cepa Ctpx3-5 presentó mayor contenido de sólidos solubles totales con un promedio de 5,25 (mg/g), a comparación del testigo con un valor menor de 2,88 (mg/g) (Tabla 7).

Tabla 7

Promedio \pm desviación estándar del contenido de sólidos solubles totales (SST), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.

Tratamiento	SST (mg/ g)	
Ctpx3-5	5,25 \pm 1,19	A
Ctpx2-1	3,50 \pm 0,91	A B
Testigo	2,88 \pm 0,75	B

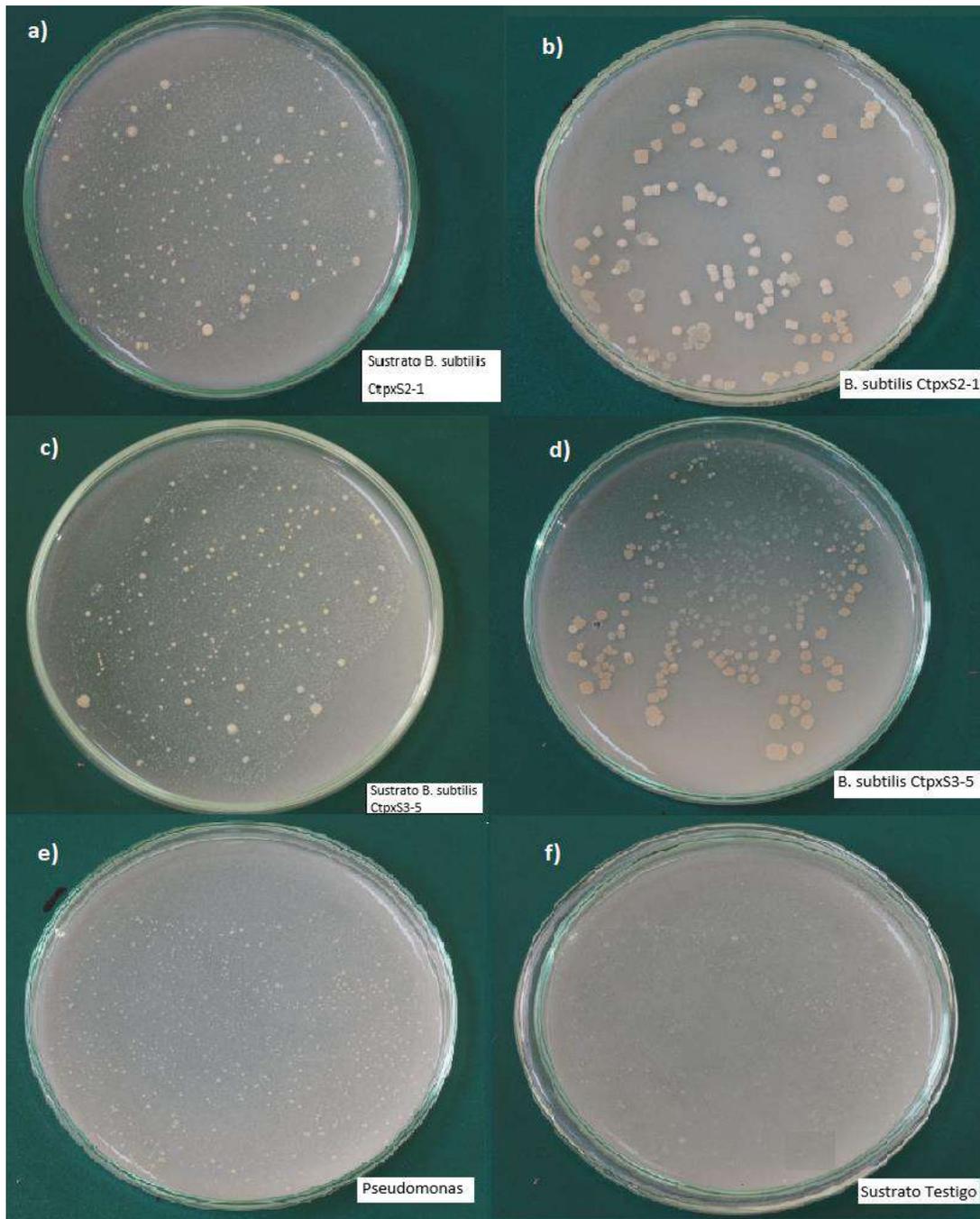
Nota. Medias en la misma columna con letra diferente difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha > 0,05$)

Solubilización de fosfatos

Con relación a la solubilización de fósforo, los resultados obtenidos mediante diluciones sucesivas (hasta 10^{-3}) de las colonias de *B. subtilis* CtpxS2-1 (Figura 25b) y CtpxS3-5 (Figura 25d) y muestras de rizósfera inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 (Figura 25a) y CtpxS3-5 (Figura 25c) en medio Pikovskaya, presentaron un halo de crecimiento transparente alrededor de las colonias, considerando resultados positivos al evidenciar el viraje de color por efecto de la solubilización de fosfato (Romero *et al.*, 2019), a comparación del testigo (Figura 25f) que no desarrolló halo de crecimiento.

Figura 25

Inoculaciones de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio Pikovskaya, dilución 10^{-3}



Nota. a) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya, b) *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya, c) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya d) *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya, e) *Pseudomonas* (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya f) Sustrato Testigo (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya. Autoría propia

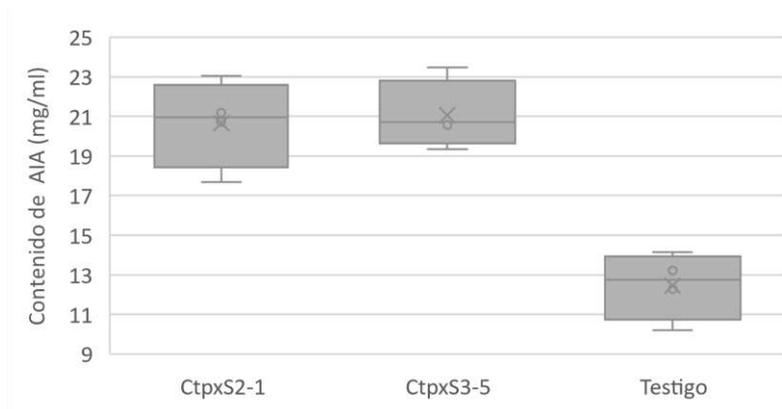
Detección y cuantificación de auxinas

Con relación a la cuantificación y detección de auxinas (AIA) por espectrofotometría, a partir de muestras de raíz de las plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* Ctpx3-5 y Ctpx2-1, presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{4,25}=26,9$, $p<0,0002$) como indica la tabla 10.

Se evidenció mayor concentración de AIA (21,5 mg/ml) en las raíces de las plantas de chocho tratadas con inoculaciones periódicas de *B. subtilis* Ctpx3-5, al igual que el tratamiento *B. subtilis* de la cepa Ctpx2-1 con 20,46 mg/ml de auxina, a comparación del testigo con una concentración de 12,46 mg/ml de auxina (Figura 26).

Figura 26

Efecto de inoculaciones con dos cepas de B. subtilis en los promedios y límites superiores e inferiores de auxinas (mg/ml) en hojas de L. mutabilis a lo largo de tres meses



Nota. *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), Testigo (agua destilada). Autoría propia.

Tabla 8

Promedio \pm desviación estándar del contenido de auxinas (AIA), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.

Tratamiento	AIA (mg/ml)	
CtpxS2-1	20,66 \pm 2,23	A
CtpxS3-5	21,05 \pm 1,74	A
Testigo	12,46 \pm 1,69	B

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

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* de las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promovieron mayor crecimiento de las plantas de chocho, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Falconí *et al.*, (2022) evaluando la inducción en la resistencia sistémica y promoción de crecimiento contra antracnosis, en plantas de chocho mediante la inoculación de *B. subtilis* (Yáñez & Falconí, 2021); como también en el estudio realizado en *Solanum lycopersicum* (tomate), utilizando PGPR del género *B. subtilis* para promover el crecimiento del tomate y para el control biológico de patógenos como *Fusarium* (Ruelas *et al.*, 2023).

Al evaluar el establecimiento de la bacteria en la rizósfera de plantas de chocho, se evidenció que en los primeros 30 días no hubo crecimiento de *B. subtilis* de las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5, resultados que coinciden con Feng *et al.* (2016), en cuyo estudio mencionaron que la población de *B. subtilis* inicialmente se reduce en la filósfera de fresa bajo invernadero, pero más del 50% en el campo, por lo que se puede sustentar que *Bacillus subtilis* son bacterias dependientes de factores ambientales que interfieren directamente en la estabilidad y producción de metabolitos, evidenciando la dificultad de predecir la respuesta de las bacterias cuando se liberan al medio natural (Falconí *et al.*, 2022)

Sin embargo, según Falconí *et al.* (2022) una vez que alcanza la adhesión y colonización en la rizósfera o filósfera, la población de *B. subtilis* llega a permanecer estable por un periodo de tiempo equivalente a $7,0 \log_{10}$ UFC/g, evaluado en la filósfera del lupino después de la pulverización de la bacteria durante dos meses, datos que al comparar con esta investigación fueron distintos, lo cual se evidenció que en la rizósfera inoculada en plantas de chocho con *B. subtilis* la cepa CtpxS2-1 presentó a una estabilidad de alrededor de $5,82 \log_{10}$ (UFC/g) y $6,09 \log_{10}$ (UFC/g) de la cepa CtpxS3-5 a lo largo de tres meses de inoculaciones continuas (Figura 19).

Según lo indicado, Castañeda & Sánchez (2016) mencionan que *B. subtilis* demuestra ser una de

las especies con mayor velocidad de crecimiento (Falconí *et al.*, 2022), llegando a estabilizarse para posteriormente descender evidenciando que la tasa de reproducción es igual a la de mortalidad, proceso donde los microorganismos mueren en diferentes periodos ya que no todas se desarrollan en el mismo tiempo.

Las rizobacterias (PGPR) son capaces de producir sustancias orgánicas como auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquininas (Cabello *et al.*, 2019), permitiendo el desarrollo y regulación de parámetros fisiológicos, bioquímicos y morfológicos (Camelo *et al.*, 2011), como se sustenta en algunos estudios realizados en plántulas de trigo (*T. aestivum* L.) (Abbasi *et al.*, 2011), tomate (*S. lycopersicum* L.) (Almoneafy *et al.*, 2012) y chocho (*L. mutabilis*) (Yáñez & Falconí, 2021); los cuales en este estudio los resultados fueron similares verificando la promoción de crecimiento mediante inoculaciones periódicas de *B. subtilis* presentado incremento de AIA en las raíces de las plantas de chocho, donde la cepa Ctpx3-5 obtuvo 21,5 mg/ml de AIA comparado con el tratamiento testigo de 12,46 mg/ml de auxina presente en las raíces de chocho (Figura 26). A Su vez, El valor del 65% de los datos de la altura en plantas de chocho desde los 30 a los 75 días, tratadas con inoculaciones periódicas de CtpxS3-5, presentaron respuestas numéricamente positivas frente al testigo (Figura 17d); coincidiendo con Castañeda & Sánchez (2016) que mencionan que la tasa de crecimiento máxima de las plantas, están limitadas por la capacidad de las bacterias de procesar nutrientes; Cabello *et al.* (2019) mencionó en su estudio que la concentración de IAA es directamente proporcional al crecimiento del tallo inhibiendo el crecimiento de raíz, mediante inoculaciones de *B.subtilis* que promovieron el crecimiento del tallo en un 45% a comparación del 17% del control absoluto.

Rojas *et al.* (2016) verificaron que mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleóptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias, coincidiendo con los resultados en esta investigación, donde el 84% de los datos presentaron respuestas positivas entre el volumen (cm³) y área (cm²) de las raíces de las plantas de chocho tratadas con

inoculaciones de *B. subtilis* CtpxS3-5 obteniendo mayor formación de raíces secundarias y por tanto, aumento en el área y volumen de raíces, e inhibiendo el crecimiento de raíz primaria debido al incremento de AIA, a su vez el 64% de los datos de las raíces de las plantas de chocho tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 presentaron respuestas numéricas más bajas en el área y volumen, estimulando el crecimiento de la raíz primaria y reduciendo las raíces secundarias debido a la disminución de AIA,

Corrales *et al.* (2017) mencionaron que los efectos benéficos del género *Bacillus* en la rizósfera están relacionados con la producción de auxinas afectando el crecimiento de raíces laterales y permitiendo el aumento de la capacidad de la planta en la absorción de nutrientes, a partir de mecanismos de fijación biológica de nitrógeno (Ortega *et al.*, 2022) y la solubilización de fósforo (González, 2019); lo que está relacionado con esta investigación donde se evaluó el contenido de proteína a partir de la colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* obteniendo promedios mayores en el contenido proteico en el tratamiento inoculado con *B. subtilis* CtpxS3-5 de 8842,05 mg de proteína extraída/g de material seco, a comparación del testigo (Figura 22).

A su vez, el contenido de sólidos solubles totales determinado en esta investigación en hojas de las plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml) ($F_{4,256} = 6,47$ $P = 0,0182$), presentaron diferencias significativas, donde la cepa Ctpx3-5 tuvo mayor contenido de sólidos solubles totales con un promedio de 5,25 (mg/g), a comparación del testigo (Tabla 9), permitiendo evaluar la cantidad de carbohidratos solubles y compuestos nitrogenados presentes por gramo de material vegetal fresco, coincidiendo con lo obtenido con Bonilla *et al.* (2021) quienes mencionan que *Bacillus* está conformado por dos componentes proteicos (b-proteínas y a-proteínas) sensibles al oxígeno, que regulan la enzima nitrogenasa permitiendo la disponibilidad de nitrógeno en las plantas, quienes sugieren realizar el análisis proteico y sólidos solubles totales para verificar el proceso de fijación de N_2 de las rizobacterias.

Además, se determinó cualitativamente la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas y de la

rizósfera inoculada de *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml) en medio libre de nitrógeno (Ashby manitol), presentando notablemente crecimiento de las cepas estudiadas; al igual se aisló *Pseudomonas sp.* como control negativo, concordando con Bonilla *et al.* (2021) quien menciona que las *Pseudomonas sp.* a pesar de ser consideradas como bacteria de vida libre, no presentan crecimiento en medio libre de nitrógeno, coincidiendo con Sangoquiza *et al.* (2018) quienes mencionan que las características principales de *Pseudomonas sp.* son el control de patógenos, producción de sideróforos y como solubilizador de fósforo.

La solubilización de fósforo evaluado de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 (Figura 25b) y CtpxS3-5 (Figura 25d) y de las muestras de rizósfera inoculada en medio Pikovskaya, evidenciaron un cambio de viraje, con resultados similares al estudio realizado por Mejía *et al.* (2022), quienes mediante inoculaciones de *Bacillus sp.*, y *B. cereus* en plántulas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.), evidenciaron la capacidad solubilizadora de fósforo y producción de auxinas mediante aislados en medio Pikovskaya que fueron considerados positivos debido a la formación de halos de color amarillo en el medio de cultivo que contenía azul de bromofenol como indicador.

La identificación de clorofila en vegetales permite estimar el estado de nutrientes en el cultivo como el nitrógeno, hierro y magnesio, según el estudio realizado por Alamilla *et al.* (2020) en plantas de acelga, *B. subtilis* ($0.92 \text{ mg/ml} \pm 0.25$) y vermicomposta ($0.92 \text{ mg/ml} \pm 0.23$) presentaron un aumento en la promoción de crecimiento, concentraciones de clorofila y carotenos; datos que coinciden con esta investigación tomados cada 15 días en 3 folíolos de las hojas del tercio medio de las plantas de chocho obteniendo una mayor tendencia en el contenido de clorofila del tratamiento inoculado con *B. subtilis* Ctpx3-5, con valores que rodean de 26 a 44 unidades de CCI como indica la figura 23, utilizando el dispositivo CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Science), coincidiendo con Callejas *et al.* (2013) que a partir de los dispositivos SPAD-502 (650 nm rojo y 940 nm infrarrojo) y CCM-200 (665 nm rojo y 940 nm infrarrojo) midieron el contenido de clorofila en hojas de *V. vinifera* var. Thompson Seedless y Red

Globe, obteniendo mayor concentración de clorofila y tasas altas de eficiencia fotosintética en el tercio medio en hojas más cercanas al racimo durante periodos de brotación y floración, debido a la alta movilidad que posee el nitrógeno en el tercio medio de las plantas, permitiendo la acumulación de clorofila y nitrógeno en las hojas, a su vez destacaron la importancia de la elección del estado fenológico y la ubicación de la toma de datos con estos instrumentos para obtener datos confiables.

Además, se realizó la extracción de clorofila (Chla, Chlb y Chla+b) mediante métodos bioquímicos, los cuales presentaron diferencias significativas para cada tratamiento y repetición ($F_{4,25}=6,94$; $P < 0,0150$) (Tabla 8). El contenido de Chla+b en el tratamiento con *B. subtilis* de la cepa Ctpx2-1, y el tratamiento con *B. subtilis* de la cepa Ctpx3-5, presentaron mayor contenido 12,12 ug/ml y 12,48 ug/ml respectivamente, que el tratamiento testigo con un promedio de 6,31 ug/ml (Figura 24); lo que concuerda con Acurio *et al.* (2020) donde se inocularon bacterias promotoras de crecimiento de *Bacillus* sp. a plántulas de *S. lycopersicum* evidenciando el aumento de la actividad fotosintética al doble frente a los controles, permitiendo que los nutrientes estén a disposición para la planta, evitando procesos de estrés.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Las inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 incrementaron las nitrogenasas, fitasas, y crecimiento del chocho bajo invernadero.
- El efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la altura y área de las plantas de chocho, la cepa CtpxS3-5 presentó mayor altura ($R^2=0,65$) y correlaciones significativas ($R^2=0,84$) entre el área y el volumen de las raíces de las plantas obteniendo mayor formación de raíces secundarias.
- De acuerdo a la dinámica poblacional de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentes en la rizósfera del suelo del chocho, la cepa Ctpx2-1 tuvo mayor número de Unidades Formadoras de Colonias por cada gramo de rizósfera recolectado (UFC/g), logrando estabilidad alrededor de $5,82 \log_{10}$ (UFC/g) después de cada aplicación a lo largo de tres meses de evaluación.
- Con aplicaciones periódicas *B. subtilis* CtpxS3-5 se obtuvo los mejores resultados en cuanto a la fijación de nitrógeno (8842,05 mg/g); índice de clorofila (26 a 44 unidades de CCI); sólidos solubles totales (5,25 mg/g); solubilización de fósforo evidenciando cambio positivo al desarrollar un halo transparente alrededor de las colonias; y mayores concentraciones de AIA (21,5 mg/ml) en las raíces.

Recomendaciones

- Con la finalidad de aumentar la promoción de crecimiento y mejorar la disponibilidad de fitasas y nitrogenadas en las plantas se recomienda el uso de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5.
- Realizar investigaciones complementarias para *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 con la finalidad de mejorar la capacidad de crecimiento y comportamiento con respecto a las condiciones fisiológicas, agronómicas y ambientales.
- Realizar aplicaciones periódicas con *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en periodos de tiempo más corto, con el fin de aumentar las unidades formadoras de colonia en la rizósfera y mejorar la calidad y productividad de las plantas.
- Es importante efectuar control de calidad del producto para lograr mejores resultados en los beneficios de *Bacillus* sobre las plantas.
- En las inoculaciones realizadas con el medio Pikovskaya es recomendable añadir azul de bromofenol, para hacer más notoria la presencia de halos de color amarillo en el medio de cultivo como respuesta positiva a la solubilización de fósforo de las bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, M., Sharif, S., Kazmi, M., Sultan, T., & M. Aslam. (2011). Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems*, 145, 159–168.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263504.2010.542318>
- Acurio, R., Tenorio, E., Medrano, K., & Chiluisa, V. (2020). Identificación molecular de cepas de *Bacillus* spp. y su uso como rizobacteria promotora del crecimiento en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Scientia Agropecuaria*, 11(4).
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172020000400575
- 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>
- Almoneafy, A., Xie, G., Tian, W., Xu, L., Zhang, G., & Ibrahim, M. (2012). Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt. *Afr. J. Biotechnol*, 11, 7193–7201.
https://www.researchgate.net/publication/224832677_Characterization_and_evaluation_of_Bacillus_isolates_for_their_potential_plant_growth_biocontrol_activities_against_Tomato_bacterial_wilt
- Aranda, N. (2014). *Fijación biológica del N2* (Vol. 1) [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Córdoba]. <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-7-Fijaci%C3%B3n-biol%C3%B3gica-de-nitr%C3%B3geno.pdf>
- 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&tIng=es#aff1
- Callejas, R., Kania, E., Contreras, A., Peppi, C., & Morales, L. (2013). Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. *SciELO*, 31(4), 19–26. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292013000400003
- 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>
- Carrillo, L. (2007). *Microbiología General*.
<http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/0%20mgral.pdf>
- Castañeda, E., & Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53–62.
- Centro de información y Comunicación Ambiental de Norte América. (2015). Ciclo del Nitrógeno. *Wiki*, 4.
http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/webfm_send/109
- 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&tIng=es
- Chávez, E. (2018). *Evaluación enzimática de la semilla de chocho (Lupinus mutabilis) posterior a la radiación solar* [Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14605>
- 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>

Díaz, A. (2018). *Evaluación de la actividad fitoregulatora 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>

Elanchezhiyan, K., Keerthana, U., & Nagendran, K Prabhukarthikeyan, S. (2018). Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 92101. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0885576518300158?via%3Dihub>

Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. (2021). *Producción de chocho en toneladas métricas (Tm) por provincias en el Ecuador*.

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

[inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Boletin Tecnico ESPAC 2020.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Boletin_Tecnico_ESPAC_2020.pdf)

Falconí, C., & Yáñez, V. (2022). Available Strategies for the Management of Andean Lupin Anthracnose. *Plants*, 11(5), 654. <https://www.mdpi.com/2223->

[7747/11/5/654#:~:text=Treatment%20of%20Andean%20lupin%20seed,infections%20and%20promotes%20seedlings%20emergence.](https://www.mdpi.com/2223-7747/11/5/654#:~:text=Treatment%20of%20Andean%20lupin%20seed,infections%20and%20promotes%20seedlings%20emergence.)

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_Strains_Efficiently_Control_Lupin_Anthracnose_Both_under_Greenhouse_and_in_Field_Conditions

Feng, W., Xiaoping Hu, & Xiangming Xu. (2016). Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. *Scientific Reports*, 6, 1–9.

<https://www.nature.com/articles/srep22611.pdf>

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Slaviša, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol*, 285.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165618305844>

González, B. (2019). *Análisis de máxima actividad de fosfatasa y fitasa 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%a1lez%20Arias%20%20-A.pdf>

Herrera, B., Campos, J., & Behrens, N. (2008). Cofactor FeMco (M = Mo, V, Fe) en la nitrogenasa.

Educación Química, 19(1), 8. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2008000100006

Intriago, L. (2021). *Efecto del tratamiento de semillas con Zn sobre la germinación y vigor de plántulas de maiz dulce (Zea mays l.) var. Bandit* [Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26766/1/T-IASA%20I-004407.pdf>

Mejía, M., Pacheco, J., & Reyes, A. (2022). *Bacillus* spp. en el crecimiento y rendimiento de *Capsicum chinense* Jacq. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 1–13.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342022000100115

Ongena, M., Guillaume, H., & Thonart, P. (2009). The Roles of Cyclic Lipopeptides in the Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis*. *ResearchGate*, 8, 59–69.

https://www.researchgate.net/publication/226237776_The_Roles_of_Cyclic_Lipopeptides_in_the_Biocontrol_Activity_of_Bacillus_subtilis

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1982). *El cultivo y la utilización del tarwi *Lupinus mutabilis* Sweet* (1a ed). <https://www.worldcat.org/es/title/cultivo-y-la-utilizacion-del-tarwi-lupinus-mutabilis-sweet/oclc/14687689>

- Ortega, R., Torres, P., Segura, R., Echeverría, F., & Uribe, L. (2022). Aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno en banano (*Musa AAA*). *Corbana*, 33(3).
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212022000300005&script=sci_abstract&tIng=es
- Peralta, E. (2016). *El chocho en Ecuador "Estado del arte"* (1a ed). INIAP, PRONALEG.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3938/1/iniapscdpCD99.pdf>
- Pilatuña, M. (2018). *Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y bioestimuladoras del crecimiento vegetal con potencial en la producción de biofertilizantes* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28545/1/Tesis-208%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20599.pdf>
- Rojas, M., Tejera, B., Bosh, D., Ríos, Y., Rodríguez, J., & Heydrich, M. (2016). Potentialities of *Bacillus* strains for promoting growth in maize (*Zea mays* L.). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(13), 485–496. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v50n3/cjas16316.pdf>
- 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&Ing=es&nrm=iso&tIng=en
- Ruelas, J., Peinado, L., Romero, C., Mendoza, C., Celaya, H., Preciado, P., Ayala, Q., & Núñez, F. (2023). Role of *Bacillus subtilis* and phosphorus doses on macronutrient concentration, partitioning and uptake of common bean. *Terra Latinoamericana*, 41, 1–18.
<https://www.terralatinoamericana.org.mx/index.php/terra/article/view/1056>
- Sánchez, E., Castañeda, M. D., Báez, A., & Morales, Y. (2021). Rizobacterias para el mejoramiento del cultivo de maíz (*Zea mays*). Una tecnología prometedora para la producción de maíces criollos. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 6(23), 72–92.
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/14363>

- Sangoquiza, C., Yáñez, C., & Borges, M. (2018). Respuesta de la absorción de nitrógeno y fósforo de una variedad de maíz al inocular *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. *Avances En Ciencias e Ingenierías*, 11(17), 84–95. <https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/943/1401>
- Vega, P., Canchignia, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005
- Villareal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092018000100095
- 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>
- Yáñez, V., Falconí, C., & Grijalva. (2016). *Bacillus* spp. evaluation to control anthracnose infection on

Andean lupin seed (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Crop Protection*, 89, 178–183.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.021>

Yépez, E. (2018). *Evaluación de un método no destructivo para determinar el contenido de nitrógeno foliar en *Fragaria vesca* variedad: Festival* [Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/15844>

Yumbla, M. (2006). *Estudio de factibilidad para la producción, industrialización y comercialización de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), con enfoque de granja integral en el cantón Montúfar – Carchi.* [Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito].
<https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/6326>

Zavaleta, A. (2018). *Lupinus mutabilis (tarwi). Leguminosa andina con gran potencial industrial* (1.a ed). Fondo Editorial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
[https://es.catalat.org/libro/lupinus-mutabilis-tarwi-leguminosa-andina-con-gran-potencial-industrial/#:~:text=Leguminosa%20andina%20con%20gran%20potencial%20industrial,-164%20p%C3%A1ginas&text=El%20tarwi%20\(Lupinus%20mutabilis%20Sweet,preincaicos%20en%20Olos%20pa%C3%ADses%20andinos.](https://es.catalat.org/libro/lupinus-mutabilis-tarwi-leguminosa-andina-con-gran-potencial-industrial/#:~:text=Leguminosa%20andina%20con%20gran%20potencial%20industrial,-164%20p%C3%A1ginas&text=El%20tarwi%20(Lupinus%20mutabilis%20Sweet,preincaicos%20en%20Olos%20pa%C3%ADses%20andinos.)