



***Bacillus subtilis* promueve el crecimiento e incrementa el rendimiento del cultivo de chocho
(*Lupinus mutabilis*)**

Gómez Cruz Jordhy Maurizio

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Falconí Saá César Eduardo Ph.D

04 de agosto del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de titulación: ***Bacillus subtilis* promueve el crecimiento e incrementa el rendimiento del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis*)**, fue realizado por el señor **Gómez Cruz, Jordhy Maurizio**; 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, 04 de agosto del 2023



.....
Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D

C. C. 0601556459

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



Trabajo de Titulacion_Gómez Jordhy....

Scan details

Scan time:
August 4th, 2023 at 16:4 UTC

Total Pages:
53

Total Words:
12986

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	5.1%	658
Minor Changes	1.9%	245
Paraphrased	1.6%	208
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text

🔍 Plagiarism Results: (130)

📄 **IASA I-TT-0029.pdf** 1.4%

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35808/1/ias...>

Personal

1 Evaluación del efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) bajo condicione...

📄 **Bacillus subtilis Ctpx52-1 induces systemic resistanc...** 0.2%

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33389271/>

This site needs JavaScript to work properly. Please enable it to take advantage of the complete set o...

📄 **Evaluación de un método no destructivo para deter...** 0.2%

<http://repositorio.espe.edu.ec/omui/handle/21000/15844/sh...>

DSpace Repository Evaluación de un método no destructivo para determinar el contenido de nitrógeno foliar en Fragaña vesca varia...



Escanea el código QR para:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

.....
Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D

C. C. 0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Gómez Cruz, Jordhy Maurizio**, con cédula de ciudadanía n° 1724142102, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: ***Bacillus subtilis* promueve el crecimiento e incrementa el rendimiento del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis*)** 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, 04 de agosto del 2023


.....
Gómez Cruz, Jordhy Maurizio

C.C. 1724142102



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Gómez Cruz, Jordhy Maurizio**, con cédula de ciudadanía n° 1724142102, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: ***Bacillus subtilis* promueve el crecimiento e incrementa el rendimiento del cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis*)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 04 de agosto del 2023

.....
Gómez Cruz, Jordhy Maurizio

C.C. 1715744957

Dedicatoria

A Dios, quien me ha mostrado en cada decisión la razón del estar presente en cada situación, momento y lugar. Quien me ha mostrado su amor, cuidado y fortaleza en cada día para ir a estudiar y quien proyecta bajo su voluntad el futuro que me espera.

A mis padres Mauricio Gómez y Consuelo Cruz por su apoyo incondicional, por brindarme su tiempo, dinero y esfuerzo por verme culminar, quienes con su ejemplo me han sabido motivar y por estar en los momentos más difíciles y que gracias a su experiencia y sabiduría he sabido mejorar. Pues este trabajo es dedicado para ellos y que este sea una muestra de su enseñanza y lo que pude lograr con ella.

Al resto de mi familia quienes han sido de igual manera pilares en este tiempo transcurrido los cuales me han sabido brindar su apoyo, amor, ayuda y su tiempo para llegar a este punto.

Agradecimientos

De la manera más sincera agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I por brindarme la oportunidad de estudiar y llegar a ser un profesional.

Agradezco a los docentes: Ing. Martha Vargas, Ing. Soledad Aguirre, Ing. Pedro Romero, Ing. Emilio Basantes, Doc. Patricio Pérez por sus conocimientos dentro de clase y por su ayuda más sincera para superarme y alcanzar mi meta, estaré eternamente agradecido por cada momento, por cada colaboración brindada a lo largo de mi carrera.

A mi tutor el Dr. Cesar Falconí quien me acogió para elaborar este trabajo de la mejor manera, quien se convirtió en más que un mentor, en un modelo profesional que seguir. Quien con su conocimiento y experiencia ha alimentado mi amor por la ciencia y las ganas de seguir investigando, mis más sinceros agradecimientos por cada enseñanza y momento compartido.

Al Ing. Claudio Darwin por su apoyo, su tiempo en guiarme de la mejor manera en laboratorio y por brindarme más que su profesionalismo su amistad a lo largo de este trabajo.

Agradezco a cada amistad sincera forjada a lo largo de estos años, las cuales hemos sabido estar presentes en los momentos más difíciles como estudiantes, pero sobre todo a: Gina Layedra, Siomara González, Lesly Columba quienes han sabido brindarme lo más importante de una persona su tiempo. Por darme sus fuerzas, sus conocimientos y su apoyo a lo largo de estos años. Gracias por dar parte de sentido en este viaje.

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.....	14
Abstract	15
CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN	16
Antecedentes.....	16
Justificación	17
Objetivos.....	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Hipótesis	19
CAPÍTULO II	20
MARCO REFERENCIAL	20
Cultivo de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>)	20

Origen	20
Descripción botánica	20
La raíz.....	20
El tallo	21
Las hojas	21
La flor.....	21
El fruto (Grano).....	21
Etapas fenológicas del cultivo	22
Requerimientos	22
El clima	23
El suelo	23
Precipitación	23
El riego.....	23
Rendimiento del cultivo de chocho en Ecuador.....	23
La importancia de la calidad del grano de chocho	25
Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGRP)	26
Producción de reguladores de crecimiento vegetal	27
Auxinas (Ácido Indolacético – AIA).....	27
<i>Bacillus subtilis</i>	27
Potencialidades del género <i>Bacillus subtilis</i> como inductor de crecimiento	28
CAPÍTULO III	29
METODOLOGÍA	29
Ubicación del área de investigación.....	29
Instalación de proyecto.....	29

Variables evaluadas asociadas al crecimiento	30
Cuantificación de ácido indolacético.....	30
Reactivo de Salkowski.....	30
Curva Estándar de AIA	31
Cuantificación de Ácido Indolacético.....	32
Determinación del contenido de proteína	32
Preparación de la curva de calibración	33
Preparación del reactivo de trabajo BCA (WR)	33
Procedimiento de microplaca	34
Obtención de extractos líquidos puros	34
Procedimiento de lectura de muestras.....	35
Dinámica poblacional (supervivencia de Bacillus subtilis).....	35
Índice de clorofila	35
Procedimiento de lectura de muestras.....	36
Variables evaluadas asociadas a características agronómicas	36
Número de vaina	36
Número de semillas por vaina	37
Rendimiento	37
Cantidad de semilla comercial y no comercial	37
Análisis estadístico.....	37
Tratamientos a comparar	37
Diseño experimental	37

CAPITULO IV	39
RESULTADOS	39
Resultados de variables asociadas al crecimiento	39
Dinámica poblacional de B. subtilis	39
Auxinas	40
Proteína	41
Clorofila (a)	43
Clorofila (b)	44
Variables asociadas al rendimiento	45
Rendimiento (Semilla comercial y No comercial)	45
Número de vainas y semillas	46
CAPÍTULO IV	48
DISCUSIÓN	48
CAPÍTULO VI	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
Conclusiones.....	52
Recomendaciones.....	53
BIBLIOGRAFÍA	54

Índice de tablas

Tabla 1 Estándares para la curva de calibración del AIA	32
Tabla 2 Curva estándar para determinar contenido de proteína	33
Tabla 3 Efecto de la inoculación de dos cepas <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la concentración de AIA en mg/ml en plantas de chocho en estado de cosecha.....	41
Tabla 4 Efecto de la inoculación de dos cepas <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (b) en plantas de chocho en etapa de cosecha.....	44
Tabla 5 Efecto de la inoculación de dos cepas <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (b) en plantas de chocho en etapa de cosecha.....	44
Tabla 6 Rendimiento de las plantas de chocho (semilla comercial) inoculadas con <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5.....	46
Tabla 7 Número de semillas y vainas de plantas de chocho F5 (ECU265xECU8415) inoculadas con <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5.....	47

Índice de figuras

Figura 1 <i>Fotografía del lugar de investigación</i>	29
Figura 2 <i>Esquema croquis experimental</i>	38
Figura 3 <i>Dinámica poblacional de inoculaciones quincenales por tres meses mediante aspersión de dos cepas de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la filósfera de plantas de chocho</i>	39
Figura 4 <i>Efecto de la inoculación de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la concentración de ácido indolacético en plantas de chocho en etapa de floración hasta cosecha</i>	40
Figura 5 <i>Concentración de proteínas de plantas de chocho inoculadas con dos cepas de B. subtilis</i>	42
Figura 6 <i>Concentración de proteínas (mg/ g de materia seca) de plantas de chocho inoculadas con dos cepas de B. subtilis en distintas fases fenológicas</i>	42
Figura 7 <i>Efecto de la inoculación de dos cepas B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (a) en plantas de chocho en estado de floración hasta cosecha</i>	43
Figura 8 <i>Efecto de la inoculación de dos cepas B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (b) en plantas de chocho en etapa de floración hasta cosecha</i>	45
Figura 9 <i>Peso de semilla comercial y no comercial (Tn/ha) de chocho F5 (ECU265xECU8415) proveniente de las plantas de chocho inoculadas con B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 desde la floración hasta cosecha</i>	46
Figura 10 <i>Número de semillas y vainas por planta de chocho F5 (ECU265xECU8415) inoculadas con B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5</i>	47

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la acción de dos cepas de *B. subtilis* (*CtpxS2-1* y *CtpxS3-5*) en el filo plano de plantas *Lupinus mutabilis* en la promoción de crecimiento y rendimiento vegetal. La cual se realizó en un invernadero experimental conformado por 5 camas con un cultivo establecido de cruz F5 (ECU265xECU8415), en fase de floración hasta cosecha. Los tratamientos fueron T1 control, T2 Plantas tratadas mediante aspersión con *Bacillus subtilis CtpxS2-1*, T3 Plantas tratadas mediante aspersión con *Bacillus subtilis CtpxS3-5*. En la presente investigación se midieron variables asociadas al crecimiento (Índice de clorofila, contenido de proteínas, dinámica poblacional) y variables asociadas a características agronómicas (número de vainas por planta, numero de semillas por vaina, rendimiento y porcentaje de semilla no comercial). Para el análisis estadístico se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) donde se realizó un análisis de varianza ANOVA de todas las variables estudiadas cuyas diferencias significativas entre tratamientos se evaluó mediante prueba de comparación de medias inexactas (Tukey; $\alpha = 0,05$) y prueba de contrastes ortogonales. Los resultados determinaron que las plantas de chocho tratadas con *Bacillus subtilis CtpxS2-1* promovieron su crecimiento y aumentaron su rendimiento vegetal al reportar datos superiores en comparación con los otros tratamientos aplicados.

Palabras clave: LUPINUS MUTABILIS, BACILLUS SUBTILIS, CEPAS, PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO, CARACTERISTICAS AGRONÓMICAS.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the action of two strains of *B. subtilis* (CtpxS2-1 and CtpxS3-5) on the flat phylum of *Lupinus mutabilis* plants in the promotion of plant growth and yield, which was carried out in an experimental greenhouse consisting of 5 beds with an established crop cross variety F5 (ECU265xECU8415), in the flowering stage until harvest. The treatments were T1 control, T2 plants treated by spraying with *Bacillus subtilis* CtpxS2-1, T3 plants treated by spraying with *Bacillus subtilis* CtpxS3-5. Variables associated with growth (chlorophyll index, protein content, population dynamics) and variables associated with agronomic characteristics (number of pods per plant, number of seeds per pod, yield and percentage of non-commercial seed) were measured. For the statistical analysis, a completely randomized design (CRD) was applied where an ANOVA analysis of variance was performed for all the variables studied, whose significant differences between treatments were evaluated by means of a test for comparison of inexact means (Tukey; $\alpha=0.05$) and orthogonal contrasts test. The results determined that the chocho plants treated with *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 promoted their growth and increased their plant yield by reporting superior data compared to the other treatments applied.

Keywords: *LUPINUS MUTABILIS*, *BACILLUS SUBTILIS*, STRAINS, GROWTH PROMOTION, AGRONOMIC CHARACTERISTICS.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Lupinus mutabilis es una legumbre originaria de la zona andina Sudamericana; cultivada y domesticada por los primeros pobladores hasta nuestros días (Falconí & Yáñez, 2022). Es conocido también como altramuz, tarwi, tarui y lupini; siendo rico en calcio, fósforo, hierro y ácido linoleico por lo que es considerada un súper alimento (Armijos, 2022). En el Ecuador el consumo de este tesoro alimentario es popular. Utilizado en diversas preparaciones entre las cuales podemos mencionar: leche de chocho, helado chocho, pastel de chocho, carne de chocho, entre otras que deleitan paladares en diversos restaurantes reconocidos de nuestro país (Ron, 2022). Debido a su alta calidad nutritiva este cultivo es actualmente de interés mundial, por lo que contribuye significativamente a la seguridad alimentaria y nutricional de la población global (Alarcón, 2012). Según Falconí *et al.* (2013), desde el punto de vista agronómico el chocho puede fijar nitrógeno atmosférico en el suelo que supliría los bajos requerimientos de suelo y agua. Sin embargo, presenta susceptibilidad a enfermedades radiculares y foliares de las cuales la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* es la más devastadora (Falconí & Yáñez, 2022), de igual manera el chocho es susceptible a cambios climáticos lo cual limita su explotación (Yáñez & Falconí, 2018). Por tal motivo, desde 1960 los investigadores han intentado resolver algunos problemas agronómicos relacionados con la siembra, fertilización y rotación con otros cultivos para mejorar su productividad y comercialización. Considerando que la industria alimentaria exige una producción continua de semillas de chocho de alta calidad, en volúmenes adecuados y uniformidad para mantener sus procesos (Falconí & Yáñez, 2022). El chocho en Ecuador se caracteriza por sus bajos rendimientos en la zona andina. Según la producción por hectárea a nivel nacional se encuentra en 0,40 t/ha, bajos en comparación a producciones internacionales como Australia o el Oeste

de Europa que superan las 1,5 t/ha (Falconí & Yáñez, 2022). Las estadísticas sugieren la necesidad de investigar las causas que inciden en los bajos índices de producción de chocho por hectárea cultivada (Caicedo *et al.*, 2010).

En el país se cultiva la variedad a la que los campesinos la conocen como “criolla”; sin embargo, INIAP posee dos variedades, mejoradas por el color blanco del grano y la precocidad del cultivo, INIAP450 y INIAP-451 que en condiciones favorables y con el uso correcto de agroquímicos alcanzan entre 1.35 t/ha y 1.39 t/ha respectivamente (Sarango, 2017). Investigaciones recientes como el trabajo de Yáñez & Falconí (2018) mencionan que las cepas de *Bacillus* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 son agentes potenciales para control de fitopatógenos y como estimuladores de crecimiento, pues en sus resultados describe que: “las cepas de *Bacillus spp.* son agentes potenciales para controlar infecciones causadas por antracnosis en semillas de chocho mediada por la producción de lipopéptidos y que estos además afectan positivamente a diversos procesos fisiológicos y al crecimiento general de las plántulas de chocho”. El presente trabajo busca evaluar los efectos de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en plantas de chocho Andino por su posible inducción de hormonas, proteínas e incremento de características agronómicas por la presencia de lipopéptidos de dichas bacterias liberadas en la filósfera desde la etapa de floración a la cosecha.

Justificación

La investigación se enfocará en evaluar la aplicación de productos a base de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGRP). La producción de chocho Andino es muy baja, no satisface la demanda del mercado local. Debido a las escasas alternativas de procesamiento, la casi nula existencia de información sobre nuevas tecnologías y la falta de difusión de nuevas investigaciones; los agricultores usan labores tradicionales hecho que no permite aprovechar el máximo potencial de rendimiento (Falconí & Yáñez, 2022).

Además, el uso extensivo de agroquímicos para alcanzar un desarrollo vegetal compromete las producciones agrícolas sostenibles y el medioambiente. De allí, la importancia de implementar estrategias alternativas para reducir el uso de agroquímicos y mantener o mejorar el nivel de desarrollo vegetal y de rendimiento (Hernández *et al.*, 2022).

Otro aspecto a destacar, es la baja condición socio-económica de las familias que se dedican a la producción del chocho, cuyos ingresos dependen netamente de la cantidad y sobre todo de la calidad del grano (Acosta, 2008).

Por estas razones, se busca mejorar la cantidad y calidad del grano de chocho implementando nuevas tecnologías como el uso de estimuladores biológicos que promuevan el crecimiento y desarrollo para obtener una mayor producción (Acosta, 2008).

Según Armijos (2022), en la última década la agroindustria ecuatoriana ha aprovechado el valor nutricional y proteico del chocho ampliando su uso culinario y también en otras áreas de interés productivo. Así, los productos innovadores en base a esa materia prima, trascienden el mercado nacional y cada día son más multinacionales que demandan a los agricultores productos agrícolas que cumplan con estándares de calidad especializados, uno de los cuales forma parte el chocho (Analuisa *et al.*, 2020). La presente investigación propone la aplicación de *Bacillus spp*, los mismos que constituyen uno de los grupos de bacterias más estudiadas sin embargo sus múltiples relaciones con las plantas aún quedan por dilucidar, contribuyendo al desarrollo de sus estructuras a partir de mecanismos bioquímicos para reducir el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos. Se estima que los resultados obtenidos de este estudio permitirán a los agricultores conocer si la aplicación de *Bacillus spp* estimula o no un mayor crecimiento de plantas de chocho y si promueven un aumento en el rendimiento enmarcado en un control natural.

Objetivos

Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* Ctpx 2-1 y Ctpx 3-5 como promotoras de crecimiento y rendimiento vegetal en plantas de chocho (*Lupinus mutabilis*).

Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la concentración de ácido indolacético en ápices de chocho tratados mediante aspersión con 2 cepas de *Bacillus subtilis*.
- ✓ Estimar quincenalmente la concentración de proteína y el índice de clorofila en hojas de chocho tratado mediante aspersión con 2 cepas de *Bacillus subtilis*.
- ✓ Cuantificar el número de vainas, número de granos por vaina, rendimiento, semilla comercial y no comercial como variables asociadas al rendimiento del cultivo de chocho tratado mediante aspersión con 2 cepas de *Bacillus subtilis*.
- ✓ Evaluar, la dinámica poblacional de dos cepas de *Bacillus subtilis* presentes en la filósfera del cultivo de chocho, como producto de aplicaciones quincenales.

Hipótesis

- ✓ H0: La aplicación por aspersión de *Bacillus subtilis* en plantas de chocho no incrementa significativamente la concentración de ácido indolacético, concentración de proteína, índice de clorofila y el rendimiento (nro. vainas y nro. de grano por vaina, rendimiento, semilla comercial y no comercial) del cultivo.
- ✓ H1: La aplicación por aspersión de *Bacillus subtilis* en plantas de chocho incrementa significativamente la concentración de ácido indolacético, concentración de proteína, índice de clorofila y el rendimiento (nro. vainas, nro. de grano por vaina, rendimiento, semilla comercial y no comercial) del cultivo.

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIAL

Cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis*)

Origen

El chocho es una especie del género *Lupinus domesticada* y cultivada como una leguminosa, no se conoce con exactitud sus orígenes; sin embargo, en dos extremos del planeta las culturas ancestrales más conocidas: la Incaica en oriente y la egipcia en occidente hacían ya el uso de sus bondades hace cuatro mil años. Curiosamente las dos culturas sometían sus granos a un proceso de desaguado para eliminar los alcaloides para posteriormente utilizarlas como alimento (Tapia, 2015).

Refiriéndose al cultivo de chocho sembrado, cultivado y consumido en nuestra región se dice que estos comenzaron hace 2500 A.C (Bracho, 2019), desde Venezuela atravesando todo el callejón interandino hasta llegar a Chile y Argentina (Jacobsen & Mujica, 2006).

Tal y como se consideraba este grano de antaño; hoy en día también conserva su importancia milenaria. Pues esta leguminosa puede ser aprovechada para diversos usos en pueblos andinos que practican su cultivo. Se caracteriza por su elevado contenido proteico, ácidos grasos, minerales entre otros y su gran aporte hacia la conservación de suelos y los ingresos económicos que genera a los sistemas de producción de la zona interandina (Jarrín, 2017).

Descripción botánica

Lupinus mutabilis es una especie anual de crecimiento perpendicular y dependiendo de las condiciones, cuidado y especie puede alcanzar alturas desde 0.8 m hasta los 2 m o variar entre cultivaresde muchas a pocas ramas.

La raíz

Su raíz, como el de toda planta desempeña el rol de sostén, conducción de minerales y

nutrientes. Pues es conocida por tener un grosor ancho y pivotante pero su característica más significativa es el número de nódulos nitrificantes presentes en sus raíces cuya simbiosis entre raíz y bacterias del género *Rhizobium* fijan nitrógeno el cual es un ahorro para el agricultor y un aporte para un cultivo de rotación. Por la diversidad de suelos en los que se siembra el chocho no se tiene resultados exactos de la cantidad exacta de nitrógeno que fija; sin embargo, por estimaciones calculadas por el rendimiento de cultivos posteriores al cultivo de chocho esta puede ser de 60 kg/ha (Sarango, 2017).

El tallo

Es el órgano aéreo que en la mayoría de variedades está constituido por un tallo principal de forma cilíndrica. En esta estructura existe una variación si la planta posee un tallo dominante o un tallo sin ramificaciones a uno con pocas ramas secundarias (Tapia, 2015).

Las hojas

Sus hojas presentan una forma digitada con un número variable de folíolos entre 5 a 12 de forma oblonga con pequeñas hojas estipulares en la base del peciolo. Los folíolos pueden ser elípticos o ensanchados hacia el extremo (Sarango, 2017).

La flor

La inflorescencia se da como un racimo terminal cuyas flores están dispuestas verticiladamente. Cada flor mide aproximadamente 1.2 cm de forma papiloneada; es decir, con una corola con cinco pétalos uno de estandarte y dos de quilla que envuelve al pistilo y a los estambres. En una sola planta se puede llegar a contar varias flores con llamativos colores (Tapia, 2015).

El fruto (Grano)

Todos los granos son dicotiledóneas; sin embargo, de acuerdo a la especie pueden presentar forma elipsoidal, lenticular, redondeadas y otros con bordes más definidos. Están constituidos por una

vaina en donde se acomodan en hilera de un tamaño que varía de 4 hasta los 15 mm (Sarango, 2017).

El color de las semillas es muy variable entre blanca, gris, baya, marrón y negra. En algunos casos las semillas blancas presentan manchas de distinto color atribuido a una ceja, bigote, creciente, media luna, punteada o marmoleada (Tapia, 2015).

Etapas fenológicas del cultivo

Según Yzarra & López (2011), una etapa fenológica es un periodo de tiempo en el cual una planta atraviesa un proceso de maduración donde aparecen o desaparecen órganos que en el caso del chocho se puede apreciar fácilmente identificando el estado fenológico en el que se encuentra. A continuación, las seis etapas de desarrollo:

1. Emergencia: los cotiledones emergen completamente desplegados y horizontalmente sobre el suelo
2. Etapa vegetativa: etapa de crecimiento y aparición de hojas verdaderas;
3. Racimo floral: aparece el primer racimo floral del brote terminal;
4. Floración: se abre la primera flor del racimo del tallo principal;
5. Fructificación: aparecen las primeras vainas;
6. Maduración: las semillas alcanzan un tamaño final y adquieren el color característico de la variedad. Las vainas se decoloran y se secan completamente.

Requerimientos

Para una correcta producción de chocho el cultivo está relacionado con las condiciones climáticas y edáficas en donde es sembrado; pues, la humedad, temperatura, precipitación, pH y el tipo de suelo pueden modificar la morfología de las plantas (Jacobsen & Mujica, 2006)

Otros estudios han corroborado que el cultivo de chocho requiere condiciones específicas para un mejor desarrollo como: clima, suelo, precipitación y riego.

El clima

En Ecuador el cultivo de chocho está ubicado mayormente en la zona media interandina cuya franja altitudinal va desde los 2800 a 3600 msnm. Por lo general el chocho es una planta de crecimiento moderado que muestra un mejor desarrollo a una temperatura entre 7 a 14° C, pero no es capaz de soportar heladas que se presentan a dichas altitudes (Peralta *et al.*, 2013).

El suelo

Desde antaño se registra que el chocho es capaz de crecer en suelos pobres y marginales, Sin embargo, últimas investigaciones han confirmado que las plantas de chocho se desarrollan mejor en suelos francos a franco arenosos con un pH entre 5.5 a 7.00 pero es susceptible a suelos en donde se puede acumular la humedad en exceso (Peralta *et al.*, 2013).

Precipitación

Dependiendo la variedad que se cultive la humedad puede variar; sin embargo, debido a que el chocho se cultiva sobre todo bajo seco su requerimiento óptimo oscila entre 300 a 600 mm. La planta cuando presenta floración y fructificación es susceptible a sequías la cual puede afectar seriamente la producción (Peralta *et al.*, 2013).

El riego

La planta de chocho tolera la sequía, pero en distintos estados fenológicos el cultivo requiere un riego constante pues la falta de este pondría en riesgo su desarrollo. Los estados en los que requiere más riego son: germinación, emergencia, floración y llenado de vainas (Peralta *et al.*, 2013)

Rendimiento del cultivo de chocho en Ecuador

Estrella (1986) menciona que: “al parecer el cultivo de chocho empieza a disminuir desde mediados del siglo XIX, sobre todo el que se destina a la alimentación” y señala que, “a principios de siglo el cultivo de chocho era prácticamente nulo, sin embargo, en varias provincias del norte es apreciado por los

beneficios que brinda al terreno y sus múltiples aplicaciones como el uso de tallos secos como leña”.

No es hasta los años 70 y 80 que según Comisión Económica para América Latina (1983), “el chocho se cultiva con fines comerciales en pequeñas parcelas, su producción y consumo se concentra en provincias centrales, en menor escala al norte y aún menos o casi nula al sur del país”.

A pesar de que inicia un interés comercial Peralta (2016) señala que en aquellas épocas su producción se encontraba en descenso pues de 3.116 t cosechadas en 1970 bajó a 0,723 t en 1974 y aún en 1980 bajó a 0,174 t.

Actualmente, el cultivo de chocho se encuentra sembrado en su mayoría en la zona interandina del país específicamente en las provincias de Cotopaxi y Chimborazo las cuales presentan bajas temperaturas, fuertes vientos, intensa radiación, grandes alturas y precipitación constante; sin embargo, la adaptabilidad del chocho permite su cultivo en estas condiciones (Falconí, 2012).

Después de conocer el valor nutricional de la semilla de chocho y por ende sus beneficios en el consumo humano; en las últimas décadas se han realizado varias investigaciones para mejorar su rendimiento en el cultivo de chocho o altramuz (Falconí & Yáñez, 2016); (Falconí & Yáñez, 2018); (Falconí & Yáñez, 2019) y mejorar el cuidado de su cultivo, las cuales se han introducido a los pequeños agricultores (Sarango, 2017).

De hecho, el chocho se ha vuelto parte de la dieta básica y diaria de los ecuatorianos siendo protagonista de proyectos de desarrollo en diferentes zonas contribuyendo a impulsar el comercio y mejorar la economía del país (Secretaría de Educación Superior, 2015); (Falconí & Yáñez, 2019).

Se puede señalar que, gracias al apoyo de la secretaria de Educación Superior Tecnología e Innovación, 600 familias de Chimborazo han optado como forma de trabajo el cultivo de chocho para su comercialización cuyo objetivo es su desarrollo sostenible. Chimborazo es la provincia con la mayor producción de chocho en el país con cerca de 800 hectáreas sembradas. Le sigue Cotopaxi y

Tungurahua que juntas suman 350 hectáreas (Márquez, 2020).

Según Falconí & Yánez (2022), actualmente se ha llevado un rendimiento comercial nacional promedio de 0,8 t/ha a 1,3 t/ha, en consecuencia, de nuevos desarrollos tecnológicos como siembra de chochos en surcos y el uso adecuado de agroquímicos y selección fenotípica de semillas; sin embargo, la mayor producción rara vez alcanza su nivel (Murillo *et al.*, 2002).

Además, en el 2022 con la ayuda del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), el Gobierno Autónomo de Pichincha y empresas privadas como: “La Verde” han dirigido el proyecto de implementar en Pichincha 95 hectáreas para el cultivo de chocho. Pues uno de sus objetivos es rescatar y promover su producción (MAG, 2021).

La importancia de la calidad del grano de chocho

El valor nutricional de la semilla de chocho es motivo de atención de organizaciones internacionales como, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), que junto con el Gobierno Ecuatoriano busca fortalecer el uso y consumo de esta legumbre en un contexto de seguridad alimentaria (Llerena, 2022).

Según Perrone (2021) presidente del Programa Mundial de Alimentos (WFP) en la entrevista del 11 de octubre del 2021. “los problemas de la desnutrición en el país en este tiempo son: la falta de conocimiento de los beneficios de los productos andinos, la cultura alimentaria, la falta de acceso a la salud y agua potable sin contar que en las escuelas no se educa en función de la calidad de alimentos pues no existe un conocimiento de los vegetales ni de la quinua y del chocho”.

La alimentación saludable es una necesidad fundamental que se está convirtiendo en una tendencia del consumo industrial a nivel mundial. Una de las diez tendencias alimenticias es el consumo de productos bajos en grasa que son demandados por el 63% de los consumidores los cuales se centran en productos con poca grasa saturada. Actualmente el 40% de consumidores compra alimentos bajos

encarbohidratos y el 71% revisa las etiquetas para comprobar la proporción de grasas en los alimentos que quiere adquirir (Martínez, 2005).

Desde el aspecto nutricional, el chocho es un alimento que presenta la posibilidad de competir en el mercado de los super alimentos. En Ecuador, la producción de chocho incentiva el trabajo de pequeños y medianos productores abriendo una posibilidad de competir en mercados potenciales, así, la producción de chocho destinado a la exportación como vía para el desarrollo del sector agrícola es una iniciativa motivada en los ámbitos público y privado, los mismos que se apoyan en la investigación, asistencia técnica y capacitación para crear las condiciones propicias para su desarrollo (Guaranga & Manobanda, 2022).

Tal es el caso del Ministerio de Agricultura y Ganadería que actualmente mantiene una alianza con empresas extranjeras para la exportación certificada del producto en el mercado extranjero.

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGRP)

El aumento de la población mundial en los últimos años ha impulsado la necesidad de aumentar la producción agrícola para cubrir la demanda de alimentos de la sociedad (Hernández *et al.*, 2022). Para lograr una seguridad alimentaria, los agricultores utilizan cantidades elevadas de fertilizantes y pesticidas para un vigoroso y rápido crecimiento vegetal obteniendo así una producción superior por espacio cultivable; sin embargo, el uso excesivo de agroquímicos ha tenido consecuencias en el equilibrio ecológico de los agroecosistemas lo cual hace necesario reducir el uso de estos químicos (Stamenković *et al.*, 2018).

Existen varias alternativas para reducir el uso de fertilizantes químicos y la técnica que se investiga actualmente es el uso de bioproductos a base de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) (Hernández *et al.*, 2022). Estas influyen en el rendimiento de los cultivos por poseer diferentes mecanismos directos como: la producción de sustancias que regulan el crecimiento, la

fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos. Lo que permite incrementar la absorción de agua y minerales con un efecto beneficioso sobre la fisiología de las plantas (Owen *et al.*, 2015). Entre los diferentes grupos de RPCV, el género *Bacillus spp.* constituye una fuente importante de cepas promisorias para el desarrollo de bio productos agropecuarios que permitan incrementar los rendimientos agrícolas (Hauka *et al.*, 2016).

Producción de reguladores de crecimiento vegetal

Los microorganismos promotores del crecimiento son capaces de producir fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal; este mecanismo se conoce como bio estimulación. Las principales fitohormonas estimuladoras del crecimiento en las plantas son: auxinas, citoquininas y las giberelinas (Fahde *et al.*, 2023).

Auxinas (Ácido Indolacético – AIA)

Las auxinas cumplen una función primordial en el desarrollo de las plantas. Aproximadamente, el 80% de las RPCV pueden sintetizar ácido indolacético (AIA), el cual estimula la división, alargamiento y la diferenciación celular (Mrkovacki *et al.*, 2012). Otra característica de esta hormona es la relación con la formación de raíces laterales en las plantas dicotiledóneas y las adventicias en las monocotiledóneas, junto con el incremento del grosor de las paredes celulares secundarias de las xilemas que aumenta la absorción de agua y minerales (Hernández *et al.*, 2022).

Bacillus subtilis

El género *Bacillus spp.* pertenece al género de bacterias Gram positivas formadoras de endosporas. Fue descrito por primera vez entre 1870 y 1880 por el científico Ferdinand Julius Cohn, mediante técnicas moleculares logrando subdividir en cuatro grupos de *Bacillus*, en donde *Bacillus subtilis* se encuentra en el grupo *Bacillus senso stricto* (Stein, 2005). Se caracteriza por su antagonismo que consiste en adherirse al medio seguido de una producción de antibióticos extracelulares como

enzimas líticas las cuales tienen un efecto sobre hongos patógenos inhibiendo su crecimiento (Sánchez *et al.*, 2016).

Debido a sus características morfológicas, la producción de esporas, su uso como control biológico y la formación de biofilm, ha llevado a un alto interés industrial (Yáñez & Falconí, 2021). Las esporas producidas por *B. subtilis* tienen una alta resistencia lo cual permite incrementar su nivel de supervivencia por lo cual posee la ventaja en comparación a otros organismos, lo que ha permitido que dichas bacterias sean utilizadas en el desarrollo de biopesticidas desde un punto de vista tecnológico (Ongena & Jacques, 2008).

Potencialidades del género *Bacillus subtilis* como inductor de crecimiento

Los microorganismos endófitos se encuentran en los tejidos de las plantas sin provocar efectos que desencadenen la muerte de su hospedero. Generalmente *B. subtilis* tiene el potencial de beneficiar a las plantas hospederas al incrementar la tolerancia de estrés abiótico y biótico (Corrales, 2018).

Su aplicación en distintos cultivos ha demostrado la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante sustancias orgánicas consideradas como producto del metabolismo secundario que influyen en respuestas fisiológicas de las células vegetales. Pues se ha demostrado que *B. subtilis* estimula la formación de fitohormonas que activan respuestas moleculares, bioquímicas, fisiológicas y morfológicas desde la rizosfera de la planta (Corrales, 2018).

Los microorganismos de este género son los más utilizados para la estimulación de crecimiento y el control de enfermedades cuando se aplica desde semillas hasta plántulas (Hernández *et al.*, 2022); (Yáñez & Falconí, 2021). Son considerados algunos de los mejores candidatos para el desarrollo de bioproductos eficientes por su capacidad de tener una larga vida en anaquel conservando su viabilidad (Hernández *et al.*, 2022).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Ubicación del área de investigación

La presente investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio e invernadero de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, Hacienda el Prado, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en la localidad de San Fernando, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui provincia Pichincha. Geográficamente se ubica a $78^{\circ}24'44''$ E, $0^{\circ}23'20''$ S y 2748 m.s.n.m de altitud.

Figura 1

Fotografía del lugar de investigación



Nota. Recuperado de Google Maps (2022)

Instalación de proyecto

La investigación se llevó a cabo con un invernadero experimental en zona plana cuyo interior está conformado por 5 camas de 23 metros de largo con un cultivo de chocho establecido de la cruz F5 (ECU265xEKU8415) perteneciente al banco de germoplasma de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria – IASA I, en fase de floración. El monitoreo de *B. subtilis* que permitió alcanzar los objetivos se realizó desde la floración hasta la cosecha, por tres meses.

En la primera semana se arregló el área de estudio adecuando el cultivo por medio de labores culturales como: guía de riego, aporque, tutorio, limpieza de malezas y separación con cinta de seguridad de diferente color alrededor de diez plantas de chocho correspondientes a la unidad experimental de cada tratamiento, con tres repeticiones.

Las dos cepas de *B. subtilis* fueron formuladas por la empresa One Prob S.A siguiendo los protocolos establecidos (Yáñez *et al.*, 2023). Se realizó un control de calidad para verificar su viabilidad. Para su aplicación se ajustó la concentración y dosis recomendada por el fabricante (al menos 1×10^7 UFC/ml) la cual se roció hasta el punto de escorrentía sobre las plantas marcadas. Dentro de la mezcla se añadió una dosis (1cc / l de agua) de surfactante (REDUX) y una dosis (0,2 g / l de agua) de regulador de pH y suavizador de agua (ACIDUREX) para un mayor cubrimiento de la planta.

Las inoculaciones con *B. subtilis* CtpxS2-1 y *B. subtilis* CtpxS3-5 se realizaron cada 15 días. Cinco horas después de cada inoculación se recolectó muestras de ápices y hojas. Para el caso de los ápices se colocaron en fundas ziploc oscuras y las hojas en fundas ziploc normales las cuales fueron llevadas al laboratorio.

La cantidad de ácido indolacético se determinó en ápices y concentración de proteínas e índice de clorofila en hojas posteriormente tratadas en laboratorio de acuerdo a los protocolos señalados por Intriago (2021), Fernández & Galván (2006) y Yépez (2018) respectivamente. Para la sobrevivencia de *B. subtilis* CtpxS2-1 y *B. subtilis* CtpxS3-5 se tomaron muestras de hojas previo a la nueva inoculación cada 15 días siguiendo el protocolo de Yáñez *et al.* (2012).

Variables evaluadas asociadas al crecimiento

Cuantificación de ácido indolacético

Reactivo de Salkowski

El método más utilizado es el colorimétrico, empleando el reactivo de Salkowski (Gordon & Weber, 1951). Este reactivo es una mezcla de cloruro férrico 0.5 M (FeCl_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) que

al reaccionar con AIA produce un color rosado, debido a la formación de complejos de AIA y a la reducción de Fe^{3+} (Kamnev *et al.*, 2001). El color desarrollado por reacción positiva indica la presencia de diversos compuestos indólicos como producto del metabolismo del triptófano (Rahman *et al.*, 2010).

Elaboración:

1. 15 ml de ácido sulfúrico
2. 25 ml de agua destilada
3. 0,75 ml de cloruro férrico hexahidratado (0,5 M)

Cálculo de gramos de cloruro férrico hexahidratado:

$$M = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{litros de solución}}$$

Para 10 ml inicial = 0,01 litros

$$0.5 = \frac{\text{moles de soluto}}{0,01 \text{ lt}} = 0,005 \text{ moles de } FeCl_3$$

$$1 \text{ mol de } FeCl_3 = 270,30 \text{ gr}$$

$$0,005 \text{ mol} \times \frac{270,30 \text{ gr}}{1 \text{ mol}} = 1.3515 \text{ gr de } FeCl_3 \cdot 6H_2O \text{ en } 10 \text{ ml de agua destilada}$$

En un frasco tarado se colocó 25 ml de agua destilada y 0,75 ml de cloruro férrico hexahidratado (0,5 M) que se tomó de los 10 ml de agua destilada con 1,3515 gr de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ diluido. A continuación, se agregó 15 ml de ácido sulfúrico dando un total de 40.75 ml de reactivo de Salkowski.

Curva Estándar de AIA

Para la obtención de la curva estándar de AIA se utilizó el protocolo empleado por Abad (2021). Se preparó una solución madre de 5 mg de AIA / 5 ml de acetona al 80% y a partir de ella se realizó una curva patrón tomando concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de AIA (Tabla 1) por triplicado. Se tomó 1 ml de cada solución y se le aumento 3 ml de reactivo de Salkowski (2% de $FeCl_3$ 0.5 M en 35% de ácido sulfúrico), se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y se

leyó las absorbancias a 530 nm utilizando el espectrofotómetro (espectro Flex6600). Se determinó la ecuación que relacione la absorbancia en función de la concentración de AIA.

Tabla 1

Estándares para la curva de calibración del AIA

(AIA) (ug/ml)	Volumen Solución Madre (ul)	Volumen de Agua (ul)
0	0	1000
5	5	995
10	10	990
15	15	985
20	20	980
25	25	975
30	30	970
35	35	965
40	40	960
45	45	955

Nota. Recuperado de Abad (2021)

Cuantificación de Ácido Indolacético

Se tomó 10 g de ápices de plantas de chocho las cuales fueron colocadas en fundas ziploc oscuras para evitar exposición a la luz, una vez trasladadas al laboratorio se colocó las muestras en tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio para mantener la oscuridad. Se vertió acetona al 80% hasta cubrir las muestras y se dejó reposar en congelador o refrigeradora a -4° C por 5 días para ayudar a la extracción de la AIA.

Posteriormente se colocó cada muestra junto con la acetona en un mortero para macerar, con la ayuda de un embudo se filtró el líquido obtenido a través de papel filtro en nuevos tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio hasta obtener 500 ul. Finalmente se agregó 1500 ul del reactivo de Salkowski en una relación es 1:3 y esperar 30 minutos para la reacción del reactivo. Se realizó la cuantificación de AIA en un espectrofotómetro.

Determinación del contenido de proteína

La determinación del contenido de proteína por ácido bicinonínico (BCA) es un método

altamente sensible. Esta combina la reacción de Cu^{2+} con las proteínas a analizar en medio básico produciendo Cu^+ junto con un reactivo para la detección de Cu^+ altamente sensible y selectivo denominado ácido bicinconínico (Fernández & Galván, 2006).

Preparación de la curva de calibración

Se diluyó el contenido de 1 ampolla de albumina estándar (BSA) y la solución tampón fosfato salino (PBS) en tubos de ensayo Eppendorf de acuerdo a lo indicado en la Tabla 2. Cada ampolla de 1 ml de estándar de albumina de 2 mg/ml es suficiente para elaborar un juego de estándares diluidos para cualquiera de los rangos de trabajo sugerido en la Tabla 2.

Tabla 2

Curva estándar para determinar contenido de proteína

Vial	Volumen del diluyente (μL)	Volumen y fuente de BSA (μL)	Concentración final de BSA final ($\mu\text{g/ml}$)
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 Thermo Scientific (2020).

Preparación del reactivo de trabajo BCA (WR)

Para determinar el volumen de BCA se utilizó la siguiente fórmula para determinar el volumen total de WR necesario:

$$(\# \text{ estándares} + \# \text{ incógnitas}) \times (\# \text{ réplicas}) \times (\text{volumen de WR por muestra}) = \text{volumen total de WR}$$

requerido

Remplazando por los valores de esta medición, se obtendrá:

$$(9+7) \times (3 \text{ réplicas}) \times 0,2 \text{ ml} = 10 \text{ ml de Reactivo de trabajo (WR)}$$

Se preparó el reactivo de trabajo, mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo

B, por lo que se usó 10 ml de reactivo A y 0,2 ml del reactivo B.

Procedimiento de microplaca

1. Se colocó 25 ul de cada réplica de muestra estándar de los tubos (A-I) en un pocillo de microplaca
2. Se añadió 200 ul de WR a cada pocillo y se mezclará bien la placa
3. Se cubrió la placa e incubará a 37°C durante 30 minutos
4. A temperatura ambiente se dejó enfriar la placa
5. Con el espectrofotómetro se ajustó a onda de 540-590 nm.
6. Se realizó la medición y se obtuvo la curva de calibración.

Obtención de extractos líquidos puros

Se procedió a pesar 1800 gramos de hoja de chocho de cada muestra a analizar, las cuales se colocó por individual en el interior de un tubo de ensayo de plástico etiquetado de 15 cm. Con la ayuda de un tanque de transporte de nitrógeno líquido lleno con una canastilla de 15 cm de profundidad se colocó el tubo con la muestra y se procedió a colocarlo en el interior de tanque con un tiempo estimado de 20 segundos para que la muestra entre en congelación.

Una vez congelada la muestra con unas pinzas se trituró dentro del tubo de ensayo hasta conseguir pequeños fragmentos evitando que la muestra entre en descongelación. Antes de colocar las muestras en los tubos Eppendorf se anotó el peso del tubo totalmente vacío. Con el peso inicial del tubo obtenido se colocó en su interior 1 gramo de la muestra triturada y a continuación 1 cm³ de PBS que con la ayuda de un pistón pellet se procedió a macerar en su interior. Para culminar se aforó con PBS hasta obtener 2 cm³.

Con las muestras maceradas con PBS se las colocó en la microcentrífuga (Micro Max Thermo IEC) programándola a 14000 RPM por 20 min. Una vez finalizado se extrajo 1 cm³ de sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf y se procedió a realizar una segunda centrifugación con la misma programación.

Finalizado el proceso se colocó los tubos en la crio congeladora -80° C bajo cero hasta ser utilizados en las siguientes pruebas de proteína.

Procedimiento de lectura de muestras

1. Se colocó 25 ul de cada réplica (x2) de muestra desconocida en un tubo de ensayo debidamente etiquetado.
2. Se añadió 200 ul del WR a cada tubo y se mezclará bien.
3. Se tapó e incubó los tubos a la temperatura y tiempo seleccionados: Protocolo estándar: 37°C durante 30 minutos (rango de trabajo = 20-2000 µg/ml)
4. A temperatura ambiente se enfrió las muestras.
5. Se programó el espectrofotómetro ajustado a 540 - 590 nm.
6. Utilizando la curva estándar se determinó la concentración de proteína de cada muestra desconocida.

Dinámica poblacional (supervivencia de *Bacillus subtilis*)

Para determinar la dinámica poblacional se seleccionaron aleatoriamente 10 g de hojas inoculadas previamente con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, y se colocaron en 90 ml de PBS dentro de fundas ziploc las cuales se colocaron en un agitador a 350 rpm para extraer las bacterias sobrevivientes del filoplano de la planta de lupino. Se utilizo una adaptación del método de dilución en serie y cada muestra se agito por 5 min a 100 rpm y a partir de esta dilución en serie se prepararon bancos hasta la dilución 10⁴. Se tomaron alícuotas de 50 ul de cada dilución y se sembraron en placas por triplicado utilizando la técnica de siembra superficial en medio NYDA. Las muestras se incubaron a 28 ± 1 °C durante 24 horas, y la población bacteriana contada en colonias se estimó como unidades formadoras de colonias por gramo. Para agregar homogeneidad a la varianza, los datos se transformaron a log₁₀ CFU/g (Yáñez *et al.*, 2012).

Índice de clorofila

Según el trabajo de Yépez (2018), en sus conclusiones menciona que: “Existieron diferencias

significativas entre los diferentes extractes para la obtención de la clorofila en el laboratorio siendo: etanol (90,32µg/ml) y metanol (90,28µg/ml) los que logran mayor recuperación de clorofila seguido de acetona (64,11µg/ml)". Por lo cual se modificó el método de Hiscox Israelstam remplazando la solución extractante de acetona al 80% por etanol del 96%.

Procedimiento de lectura de muestras

1. Se tomó una muestra de hoja y se cortó en tiras de 0,5 cm
2. Se pesó 0,5 g de la muestra cortada para macerarlo en un mortero adicionando 5 ml de etanol al 96%.
3. En tubos eppendorf de 5ml se colocó el resultado de la maceración y se llevó a refrigeración a -4 ° C durante 24 horas hasta extraer todo el colorante de la muestra.
4. Posteriormente se colocó la muestra en tubos de ensayo para centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
5. Se extrajo el sobrenadante que contiene los pigmentos en nuevos tubos y se aforó a 6 ml con etanol del 96%.
6. Se tomó 1 ml del sobrenadante de cada muestra y se diluyó hasta 5 ml con etanol al 96%
7. Con un espectrofotómetro programado de 645 y 663 nm se midió las muestras diluidas.

Variables evaluadas asociadas a características agronómicas

Los análisis para determinar la calidad del grano se realizaron de acuerdo a los parámetros establecidos por INIAP (2001), mencionados en el trabajo de investigación Erazo (2021) ejecutados en los laboratorios de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA – I.

Número de vaina

El número de vaina se determinó mediante el conteo del número total de vainas presentes en el eje central y en las ramas laterales de la época de cosecha (Jarrín, 2017).

Número de semillas por vaina

Después de la cosecha se procedió a desgranar las vainas de cada tratamiento y se contabilizó el número de semillas por vaina (Jarrín, 2017).

Rendimiento

El rendimiento se cuantificó por medio del peso de la semilla (g / unidad experimental) y este valor se extrapola a Tn / ha (Falconí, 2012).

Cantidad de semilla comercial y no comercial

El porcentaje de semilla comercial y no comercial se calculó tras pesar la cantidad de semilla dañada y la semilla total (Falconí, 2012).

Análisis estadístico

Tratamientos a comparar

La investigación se llevó a cabo aplicando a cada unidad experimental seleccionada de manera aleatoria uno de los tres tratamientos los cuales son:

T1 = Control

T2 = Plantas tratadas mediante aspersion con *B. subtilis* CtpxS2-1

T3 = Plantas tratadas mediante aspersion con *B. subtilis* CtpxS3-5

Diseño experimental

Las variables de respuesta asociadas al crecimiento y características agronómicas se caracterizaron mediante estadística descriptiva (media +/- desviación estándar).

Para comparar las variables de respuesta asociadas al crecimiento y características agronómicas entre tratamientos. Se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar bajo el siguiente modelo matemático:

$$y_{ij} = \mu + T_i + s_{ij}$$

y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

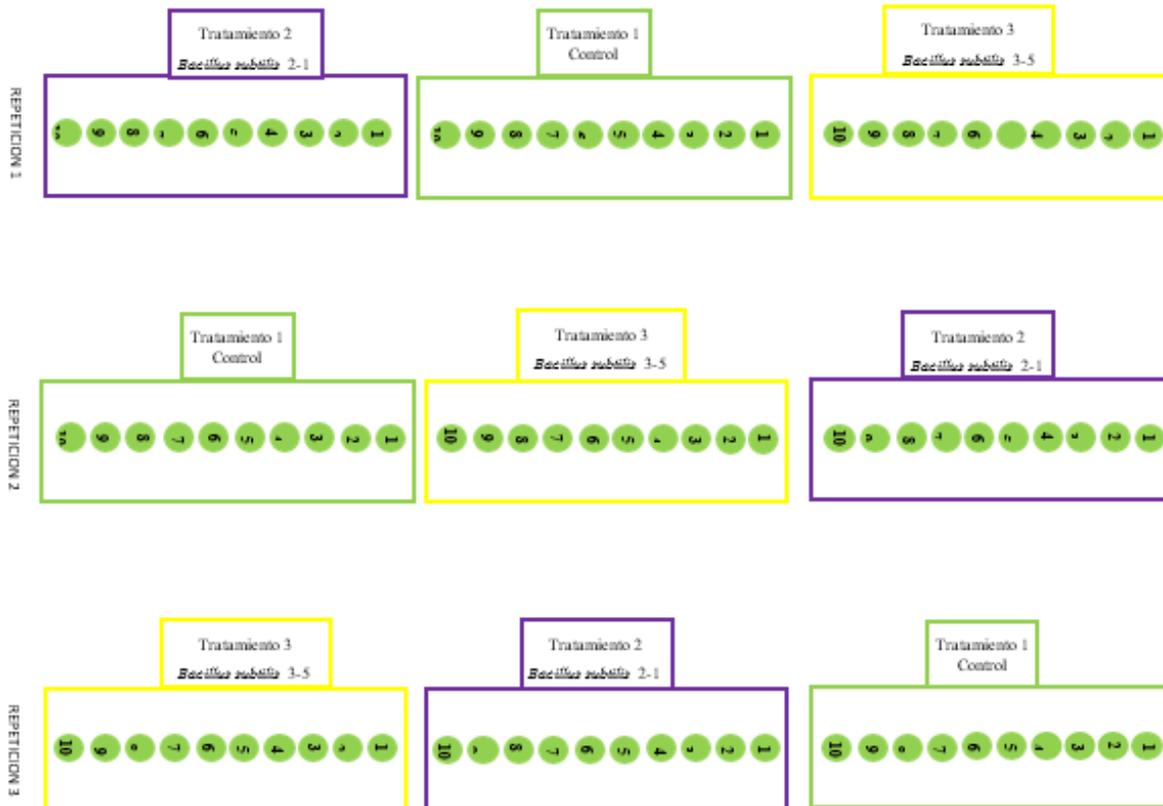
T_i = Efecto del i ésimo tratamiento

s_{ij} = Error experimental

Una vez obtenidos los valores se realizó una prueba de comparación de medias inexactas (Tukey al 5%). Este procesamiento de datos se realizó en Excel y el programa estadístico Infostat.

Figura 2

Esquema croquis experimental



Nota. Autoría propia

CAPITULO IV

RESULTADOS

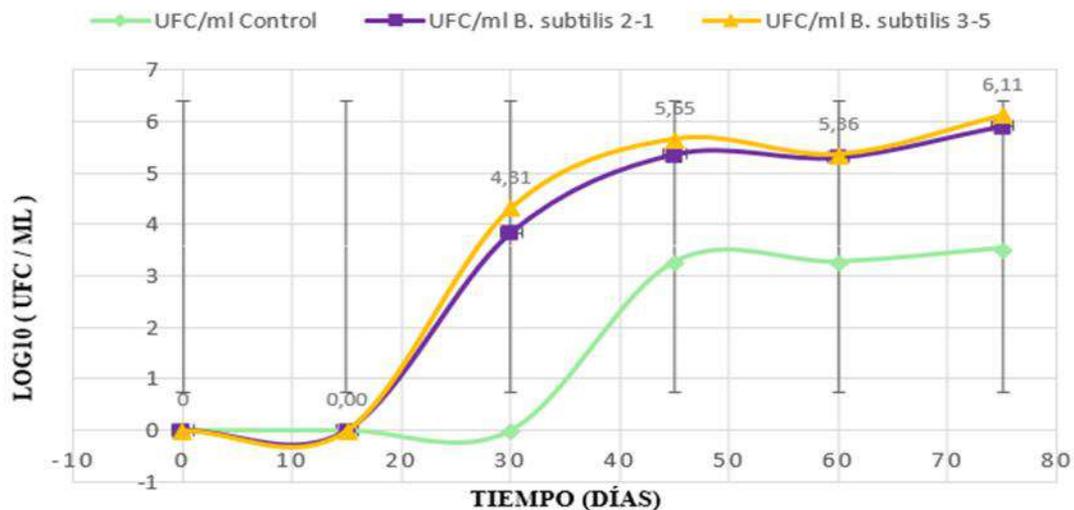
Resultados de variables asociadas al crecimiento

Dinámica poblacional de B. subtilis

Se evaluó la viabilidad de *B. subtilis* utilizando 10 gramos de muestras recogidas de la filósfera de plantas de chocho que fueron tratadas mediante aspersión con dos cepas diferentes de *B. subtilis*. Los resultados indican que el tratamiento con la cepa *B. subtilis* CtpxS3-5 mostró una mayor concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra recolectada (UFC/gr). Específicamente, se observó que la cepa CtpxS3-5 mantuvo una estabilidad alrededor de 6.11 log₁₀ (UFC/gr) a lo largo de 75 días posteriores a las inoculaciones periódicas, mientras que la cepa CtpxS2-1 alcanzó una estabilidad de 5.91 log₁₀ (UFC/g) durante el mismo período (Figura 3).

Figura 3

Dinámica poblacional de inoculaciones quincenales por tres meses mediante aspersión de dos cepas de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la filósfera de plantas de chocho



Nota. a) Para una mejor interpretación de las varianzas, los datos de concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) se transformaron a Log_{10} (UFC/gr). Donde cada punto representa la media \pm D.E, de seis inoculaciones cada 15 días. Autoría propia.

Auxinas

La concentración de ácido indolacético (AIA) en plantas de chocho tratadas con aspersion de dos cepas de *B. subtilis* (*CtpxS2-1* y *CtpxS3-5*), no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F_{2,24} = 3,13$; $p=0,0617$). Sin embargo, en el cuadro de matices se puede observar que la inoculación de *B. subtilis* (*CtpxS2-1* y *CtpxS3-5*) en las plantas de chocho aumentó la concentración de AIA en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 4).

Por otro lado, se evidenció que, en la filósfera de las plantas de chocho, *B. subtilis* *CtpxS2-1* logró incrementar la concentración de AIA al final del período de investigación, alcanzando un valor de 41,24 mg/ml, mientras que *B. subtilis* *CtpxS3-5* alcanzó 40,41 mg/ml, en comparación con el control que tuvo un valor de 38,32 mg/ml (Tabla 3). Se observó, con un nivel de confianza del 95%, que las plantas de chocho tratadas con *B. subtilis* *CtpxS2-1* podrían alcanzar una concentración de auxinas entre 38,9 y 41,08 (mg/ml).

Figura 4

Efecto de la inoculación de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la concentración de ácido indolacético en plantas de chocho en etapa de floración hasta cosecha

		Quincenas					Concentración de ácido indolacético (mg/mL)
		Quincena 1	Quincena 2	Quincena 3	Quincena 4	Quincena 5	
T r a t a m i e n t o s	Control						0 -18
							19 - 21
							22 - 26
	CptxS 2-1						27 - 31
							32 - 35
							33 - 37
	CptxS 3-5						38 - 42
							43 - 46
							47 - 50

Nota. Autoría propia

Tabla 3

Efecto de la inoculación de dos cepas B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la concentración de AIA en mg/ml en plantas de chocho en estado de cosecha

Tratamientos	Variable	Parámetro	Estimación	LI (95%)	LS (95%)
Control	Ácido indolacético	Media \pm D.E	38,32 \pm 1,6	37,08	39,55
CtpxS2-1		Media \pm D.E	41,24 \pm 2,2	38,55	43,92
CtpxS3-5		Media \pm D.E	40,41 \pm 3,5	38,74	42,08

Nota. Promedio \pm D.E del efecto de la inoculación de dos cepas de *B. subtilis* sobre la concentración de AIA y límites de confianza bilaterales con una confiabilidad del 95%. Autoría propia.

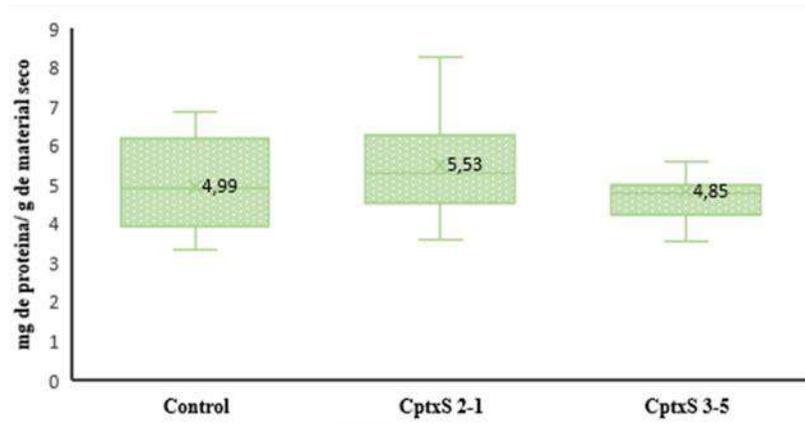
Proteína

La concentración de proteína (expresada en mg de proteína por gramo de material seco) en plantas de chocho tratadas mediante aspersión con dos cepas de *B. subtilis*, CtpxS2-1 y CtpxS3-5, no mostró diferencias estadísticas significativas ($F_{2,51} = 0,1578$; $p = 0,1578$). No obstante, al observar el diagrama de cajas, se destaca que las plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 presentaron una media superior de 5,53 mg/gr en comparación con las plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS3-5 y el grupo de control, con concentraciones de 4,85 y 4,99 mg/gr respectivamente (Figura 5).

Además, al analizar la (Figura 6), se nota que la concentración de proteínas en las plantas inoculadas con CtpxS2-1 durante el estado de envainamiento fue mayor, alcanzando una concentración de 6,29 mg/gr, mientras que las plantas inoculadas con CtpxS3-5 y el grupo de control mostraron resultados similares.

Figura 5

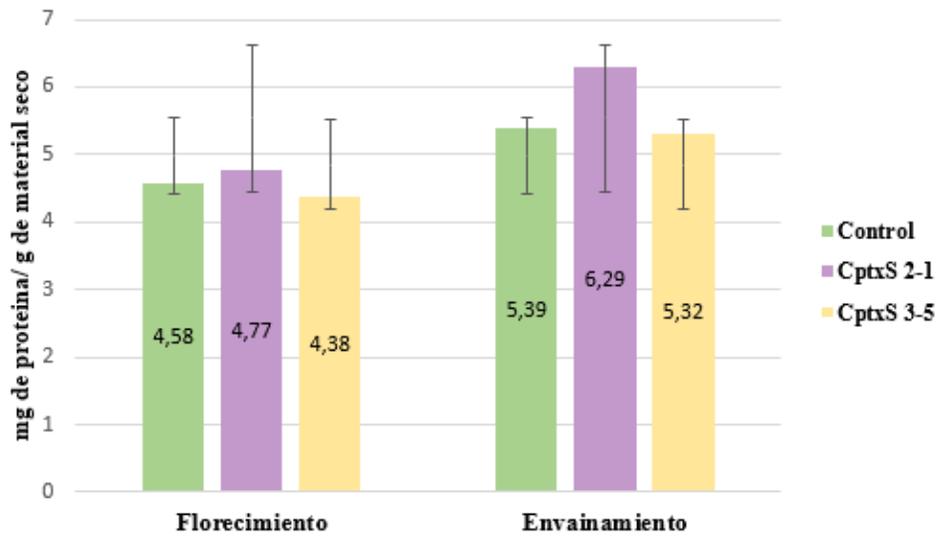
Concentración de proteínas de plantas de chocho inoculadas con dos cepas de B. subtilis



Nota. Autoría propia

Figura 6

Concentración de proteínas (mg/g de materia seca) de plantas de chocho inoculadas con dos cepas de B. subtilis en distintas fases fenológicas



Nota. Autoría propia

Clorofila (a)

El índice de clorofila (a) en plantas de chocho tratadas mediante aspersión con dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, no mostró diferencias estadísticas significativas ($H = 1,41$; $p = 0,4943$). Sin embargo, al observar el cuadro de matices, se puede notar que la inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 en las plantas de chocho aumentó el índice de clorofila en comparación con las plantas inoculadas con CtpxS3-5 (Figura 7).

Además, los resultados indican que *B. subtilis* CtpxS2-1, inoculado en la filósfera de las plantas de chocho, aumentó el índice de clorofila (a) al final del período de investigación, alcanzando un valor de 20,68 ug/ml, mientras que *B. subtilis* CtpxS3-5 mostró un valor de 20,28 ug/ml y el grupo de control tuvo un valor de 19,64 ug/ml (Tabla 4). Es importante destacar que, aunque no se encontraron diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%, se puede afirmar que las plantas de chocho tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 podrían experimentar un incremento en el índice de clorofila (a) en un rango que va desde 20,01 hasta 21,35 ug/ml (Tabla 4).

Figura 7

Efecto de la inoculación de dos cepas B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (a) en plantas de chocho en estado de floración hasta cosecha.

		Quincenas					Concentración de Clorofila a (ug/mL)
		Quincena 1	Quincena 2	Quincena 3	Quincena 4	Quincena 5	
T r a t a m i e n t o s	Control						0 - 1
							2 - 5
							6 - 9
	Bacillus subtilis 2-1						10 - 14
							15 - 18
							19 - 22
	Bacillus subtilis 3-5						23 - 26
							27 - 30
							31 - 34

Nota. Autoría propia

Tabla 4

Efecto de la inoculación de dos cepas B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (b) en plantas de chocho en etapa de cosecha

Tratamientos	Variable	Media \pm D. E	LI (95%)	LS (95%)
Control	Clorofila (a)	19,64 \pm 1,13	18,77	20,51
CtpxS2-1		20,68 \pm 0,87	20,01	21,35
CtpxS3-5		20,28 \pm 1,81	18,89	21,67

Nota. Promedio \pm D.E del efecto de la inoculación de dos cepas de *B. subtilis* sobre el índice de clorofila (a) y límites de confianza bilaterales con una confiabilidad del 95% del índice de clorofila (a). Autoría propia

Clorofila (b)

El índice de clorofila (b) (ug/ml) en plantas de chocho tratadas mediante aspersión con dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentaron diferencias estadísticas significativas ($H=6,50$; $p=0,0388$). Esto indica que, las plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* CtpxS3-5 presentaron mayor cantidad de clorofila (b) en comparación de las plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1. (Tabla 5).

Por otro lado, mediante un cuadro de matices se puede observar la diferencia de índice de clorofila (b) de plantas de chocho inoculadas en su filósfera con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 con respecto al control a lo largo del tiempo de experimentación (Figura 8)

Tabla 5

Efecto de la inoculación de dos cepas B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (b) en plantas de chocho en etapa de cosecha.

Tratamientos	Variable	Media D. E	
Control	Clorofila (b)	17,66 \pm 0,99	B
CtpxS2-1		18,12 \pm 0,99	B
CtpxS3-5		18,69 \pm 2,19	A

Nota. El índice de del índice de clorofila (b) se caracterizó con estadística descriptiva (media \pm D.E). Para comparar el índice de clorofila (b) se realizó análisis de la varianza y prueba de comparación de medias tukey ($\alpha= 0,05$). Todos los análisis fueron realizados en Infostat. Medias con letras diferentes presentan diferencias significativas. Autoría propia

Figura 8

Efecto de la inoculación de dos cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el índice de clorofila (b) en plantas de chocho en etapa de floración hasta cosecha.

		Quincenas					Concentración de clorofila b(ug/ mL)	
		Quincena 1	Quincena 2	Quincena 3	Quincena 4	Quincena 5		
T r a t a m i e n t e s	Control						0 - 2	
							3 - 5	
							6 - 8	
	Bacillus subtilis 2-1						9 - 11	
							12 - 14	
							15 - 17	
	Bacillus subtilis 3-5						18 - 20	
							21 - 23	
							24 - 26	

Nota. Autoría propia

Variables asociadas al rendimiento

Rendimiento (Semilla comercial y No comercial)

El peso de las semillas comerciales de las plantas de chocho mostró diferencias estadísticas significativas para los tratamientos evaluados ($F_{2,24}= 58,60; p<0,0001$). En consecuencia, las semillas comerciales de las plantas de chocho inoculadas con las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 tuvieron un peso superior en comparación con las semillas comerciales de las plantas no inoculadas (Tabla 6). Por otro lado, el peso de las semillas no comerciales de las plantas de chocho no mostró diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos evaluados ($F_{2,20}= 1,28; p=0,2933$).

Sin embargo, al observar el diagrama de barras que muestra el peso en toneladas por hectárea (Tn/ha), se puede apreciar que las plantas tratadas con CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentaron un peso total de 3,01 y 2,75 Tn/ha respectivamente para las semillas comerciales, en comparación con las semillas del grupo de control que registró un peso de 1,25 Tn/ha (Figura 9). Del mismo modo, para las semillas no comerciales, las plantas inoculadas con las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5 mostraron un peso menor de 0,30 y 0,28 Tn/ha respectivamente, mientras que las semillas del grupo de control alcanzaron un peso mayor

de 0,43 Tn/ha (Figura 9).

Tabla 6

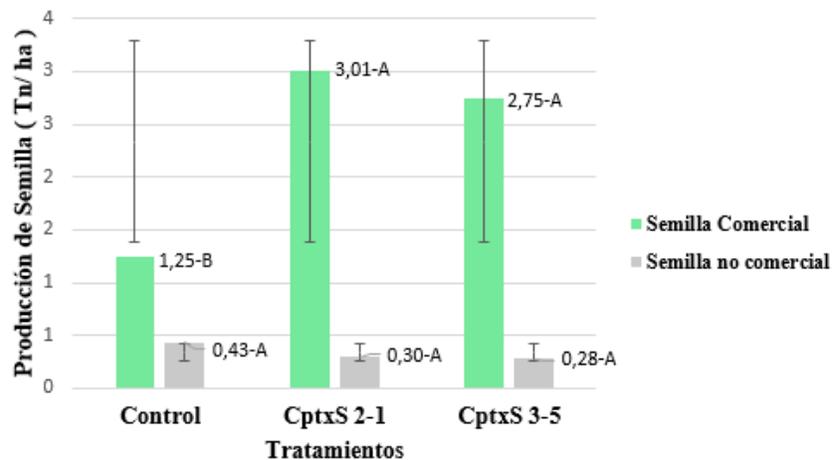
Rendimiento de las plantas de chocho (semilla comercial) inoculadas con B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5

Tratamientos	Variable	Media \pm D. E	
Control	Semilla comercial	0,20 \pm 0,21	B
CtpxS2-1		1,07 \pm 0,23	A
CtpxS3-5		1,01 \pm 0,09	A

Nota. Para comparar el rendimiento se realizó análisis de la varianza y prueba de comparación de medias tukey ($\alpha=0,05$). Previo al análisis la variable de respuesta fue transformada a logaritmo natural. Todos los análisis fueron realizados en infostat. Medias con letras diferentes presentan diferencias significativas. Autoría propia

Figura 9

Peso de semilla comercial y no comercial (Tn/ha) de chocho F5 (ECU265xECU8415) proveniente de las plantas de chocho inoculadas con B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 desde la floración hasta cosecha



Nota. Autoría propia

Número de vainas y semillas

El número de semillas de las plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 mostraron diferencias estadísticas significativas ($F_{2,24}=91,66$; $p<0,0001$). Por lo que, el número de semillas de las plantas tratadas con CtpxS2-1 y CtpxS3-5 es más alto con 465 y 417 semillas respectivamente en comparación con el número de semillas de las plantas no inoculadas de 157 (Tabla

7) (Figura 10).

Tabla 7

Número de semillas y vainas de plantas de chocho F5 (ECU265xECU8415) inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

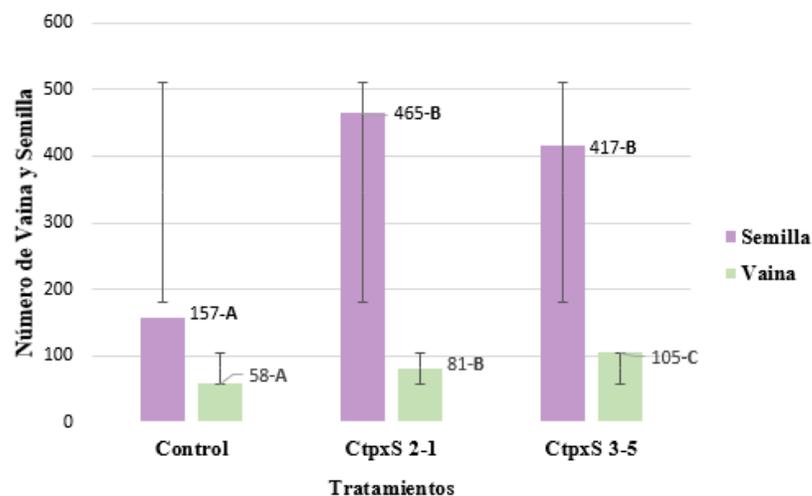
Tratamiento	Número de semillas Media ± D. E		Número de vainas Media ± D. E	
Control	157 ± 25	A	58,33±5,34	A
CtpxS2-1	465 ± 65	B	80,89 ±9,09	B
CtpxS3-5	417 ±57	B	105 ± 5,68	C

Nota. Para comparar el número de semillas se realizó análisis de la varianza y prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha= 0,05$). Todos los análisis fueron realizados en infostat. Medias con letras diferentes presentan diferencias significativas. Autoría propia.

El número de vainas de las plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 mostraron diferencias estadísticas significativas ($F_{2,24}=103,58$; $p<0,0001$). Se puede decir que el número de vainas de las plantas tratadas con CtpxS3-5 es superior a las plantas inoculadas con CtpxS2-1 y no inoculadas (Tabla 8) (Figura 10).

Figura 10

Número de semillas y vainas por planta de chocho F5 (ECU265xECU8415) inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5.



Nota. Autoría propia

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En estudios previos realizados por Loor (2022); Proaño (2022) y Calapaqui (2022) en los que se trabajó con cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en distintas plantas, se reporta una supervivencia bacteriana de 16 Log (UFC/ml) para CtpxS2-1 y de 15 Log (UFC/ml) para CtpxS3-5, destacando que dichos estudios se realizaron en rizotrones y macetas bajo condiciones controladas.

Por otro lado, en otro estudio realizado por Feng *et al.* (2016) menciona que las colonias de *B. subtilis* en la filósfera de hojas de fresa presentaron un decrecimiento no significativo bajo condiciones controladas; sin embargo, también se observó que las colonias expuestas a campo abierto redujeron su población en un 50%, debido al estrés provocado por la intensa luz solar, la sequedad y las altas temperaturas, lo que podría reducir la colonización inicial. Este efecto observado por Feng Wei se pudo corroborar en el trabajo de Falconí *et al.* (2022), donde se reporta un promedio de la población inoculada de *B. subtilis* en la filósfera de lupino estable de alrededor de 7.0 Log₁₀ UFC/g después de dos semanas posteriormente de cada pulverización y durante una evaluación de tres meses.

Con base en estas investigaciones, se puede afirmar que los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes, ya que la concentración de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la filósfera de las plantas de chocho fue de 6.11 Log₁₀ (UFC/ml) y 5.91 Log₁₀ (UFC/ml), respectivamente. Es importante tener en cuenta que algunos factores bióticos y abióticos dentro del invernadero fueron adversos como: corrientes de viento, radiación solar intensa, presencia de hongos (oídio (*Sphaerotheca pannosa*), roya (*Puccinia graminis*)).

Según Sorokan *et al.* (2021) en su estudio, destaca la importancia de la capacidad de *Bacillus subtilis* 26D para mantener niveles adecuados de ácido indolacético en las plantas, lo que facilita su adaptación frente a daños ocasionados por el escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*). Además, se demostró por primera vez que estas bacterias pueden aumentar los niveles

de fitohormonas, incluyendo el AIA (ácido indolacético), en respuesta a factores externos dañinos, lo que promueve el crecimiento de brotes. Sin embargo, es importante señalar que el impacto de esta cepa productora de fitohormonas no altera el estado fitohormonal de las plantas en condiciones normales. Sorokan *et al.* (2021) vuelve a corroborar los efectos de *Bacillus subtilis* 26D sobre los niveles de auxinas en tallos y nuevos brotes mencionados anteriormente en su primera investigación. Mientras que en la investigación de Arkhipova *et al.* (2005) del efecto de *Bacillus subtilis* IB-22 en la concentración de AIA en plantas de lechuga muestra resultados similares a los de Sorokan *et al.* (2021), donde la concentración de auxinas en brotes de plantas inoculadas con *B. subtilis* no experimenta cambios significativos. Según estas investigaciones, podemos afirmar que los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes, ya que no se observan diferencias significativas en la concentración de auxinas entre los tratamientos, lo que sugiere una similitud entre los resultados. Las pequeñas variabilidades encontradas podrían deberse a factores externos.

Según Yáñez & Falconí (2018) en su estudio se investigó el efecto de las cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el contenido de proteínas a nivel foliar en plantas de chocho, y se reportaron diferencias significativas entre los tratamientos. La concentración de proteínas producidas por cada cepa fue comparada con dos controles diferentes. El Control (1) consistió en semillas con una infección artificial de *Colletotrichum acutatum*, mientras que el Control (2) utilizó semillas sin tratar.

Los resultados mostraron que los tratamientos con la cepa CtpxS2-1 presentaron los contenidos más altos de proteínas foliares una vez que las plantas se desarrollaron, en comparación con las plantas tratadas con la cepa CtpxS3-5 y ambos controles. Previamente a esta investigación, se observó que las plantas tratadas con la cepa CtpxS2-1 también tuvieron un mayor contenido de proteína a nivel foliar tanto en el estado fenológico de floración (4,77 mg/g FW) como en el estado de envainamiento (6,11 mg/g FW), mientras que las plantas tratadas con la cepa CtpxS3-5 presentaron valores inferiores en la floración (4,38 mg/g FW) y el envainamiento (5,32 mg/g FW) en comparación con las plantas control con

(4,58 mg/ g FW) y (5,39 mg/ g FW) respectivamente.

Estos hallazgos sugieren que la cepa *CtpxS2-1* tiene un impacto más positivo en el contenido de proteínas a nivel foliar en plantas de chocho en comparación con la cepa *CtpxS3-5* y los controles utilizados en el estudio.

De acuerdo con el estudio realizado por Cusín (2021) en su investigación, se evaluó el efecto de la inoculación de la cepa *Bacillus subtilis CtpxS2-1* en el follaje de dos variedades de plantas de chocho, I-450 Andino y F3 (Ecu 2658 X Ecu 8415). Los resultados revelaron que, a lo largo de las distintas etapas fenológicas del cultivo, desde floración hasta envainamiento, el índice de clorofila en las plantas tratadas con la cepa *CtpxS2-1* fue consistentemente superior en comparación con los demás tratamientos aplicados, alcanzando su máxima concentración en el estado de envainamiento con 25 ug/ml.

Asimismo, otro estudio realizado por Cusín (2021), donde se aplicó *Bacillus subtilis CtpxS2-1* de manera foliar a nuevas variedades de plantas de chocho, I-451 Guaranguito y el cruzamiento F3 (ECU 2658 x ECU 8415), también mostró que las plantas tratadas con la cepa *CtpxS2-1* presentaban la mayor concentración de clorofila en comparación con los otros tratamientos aplicados, obteniendo valores de 35,19 ICC (ug/ml) y 37,26 ICC (ug/ml) respectivamente. En otra investigación Loor (2022) , donde se comparó el índice de clorofila al inocular dos cepas de *Bacillus subtilis CptxS2-1* y *CptxS3-5*, en plantas de tomate de árbol de manera edáfica, se encontró que en la última semana de inoculación, el índice de clorofila alcanzó su concentración máxima con valores de 70,6 (ug/ml) y 56,7 (ug/ml) respectivamente para ambas cepas, en comparación con el control, que siempre mostró valores inferiores en todas las inoculaciones, con un valor final de 38,18 (ug/ml).

A partir de los datos obtenidos en estas investigaciones, se concluye que el índice de clorofila de las plantas tratadas con *Bacillus subtilis CptxS2-1* mostró los resultados más altos, con un máximo de 20,68 (ug/ml), lo que respalda la consistencia de los hallazgos en el presente estudio.

En algunos estudios, se ha demostrado la capacidad de *Bacillus subtilis* para mejorar el

rendimiento de cultivos de interés. Por ejemplo, en el estudio de Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum L.*) cv. afrodita en invernadero (Palomeque *et al.*, 2017), se observó que la inoculación de varias Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV), incluyendo *Bacillus subtilis spp.*, en plantas de tomate resultó en un aumento significativo del rendimiento. Las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* mostraron el mayor incremento de producción, con un aumento del 28% en la producción de frutos bayas en comparación con otros tratamientos aplicados.

Además del aumento en la producción de frutos bayas, *Bacillus subtilis* también demostró incrementar la producción de vainas y la cantidad de semillas que estas contienen en plantas de fréjol. En la investigación llevada a cabo Chávez & Vásquez (2021), al aplicar un controlador biológico basado en *Bacillus subtilis* en distintas variedades de plantas de fréjol, se observó un aumento en el rendimiento tanto en el número de vainas como en el número de semillas para todas las variedades estudiadas, en comparación con el grupo de control sin la aplicación de *Bacillus subtilis*.

Estos resultados son consistentes con otra investigación realizada por Ron (2022), en la cual se evaluó el cruzamiento F3 (ECU-2658 x ECU-8415) con la aplicación de la cepa *CtpxS1-2* de *Bacillus subtilis*. En este estudio, se encontró que las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* mostraron un mayor número de vainas por planta y un mayor número de semillas por vaina, con el porcentaje más bajo de semillas no comerciales en comparación con los otros tratamientos aplicados. Las plantas tratadas con *Bacillus subtilis CtpxS2-1* en el presente estudio también mostraron un aumento en el número de vainas (81 vainas/planta) y un mayor número de semillas (465 semillas/plantas), con un rendimiento estimado de 3,1 Tn/ha y un peso mínimo de 0,30 Tn/ha de semillas no comerciales.

Estos hallazgos respaldan los resultados del presente estudio, demostrando que la aplicación de *Bacillus subtilis CtpxS2-1* resulta en un significativo aumento del rendimiento en términos de número de vainas y número de semillas por planta en el cultivo de interés.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La inoculación por aspersión de manera periódica de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en plantas de chocho no incrementó la concentración de ácido indolacético (IAA). Ya que pueden producir pequeñas cantidades de fitohormonas o compuestos similares a las hormonas vegetales, pero generalmente no son la principal fuente de fitohormonas en las plantas. Como se puede apreciar en los valores obtenidos.
- Las plantas de chocho tratadas con *Bacillus subtilis* CptxS2-1 exhibieron una mayor concentración de proteínas en estado de envainamiento (6,29 mg/g de materia fresca) evidenciando un cambio positivo en el aumento en el índice de clorofila (a) (20,68 ug/ml).
- Debido a un aumento en la concentración de proteínas e índice de clorofila en plantas de chocho tratadas mediante aspersión con la cepa CptxS2-1. Se evidencio un aumento en el rendimiento de tales plantas como: peso de semilla comercial 3,01 Tn/ha, número de vainas/ planta de 81, número de semillas por vaina de 6 y se obtuvo un peso mínimo de 0,30 Tn/ha de semilla no comercial.
- De acuerdo a la dinámica poblacional de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentes en la filósfera de plantas de chocho, la cepa Ctpx3-5 tuvo mayor número de Unidades Formadoras de Colonias por cada gramo de filósfera recolectada (UFC/g), logrando estabilidad alrededor de 6,11 Log_{10} (UFC/g) al final de tres meses de evaluación.

Recomendaciones

- El grano de chocho ha adquirido reconocimiento a nivel internacional como un "superalimento" debido a su creciente demanda, que requiere una mayor calidad y concentración de nutrientes en sus semillas. Por lo tanto, se sugiere llevar a cabo nuevos estudios complementarios para profundizar en el efecto de *B. subtilis* en los diferentes niveles de fitohormonas y su relevancia en el desarrollo y la resistencia del cultivo, aspectos que aún no han sido completamente esclarecidos.
- La aplicación de *B. subtilis* representan una innovadora alternativa para reemplazar los fertilizantes y estimulantes sintéticos en la agricultura. Sin embargo, aún muestran susceptibilidad ante ciertos factores externos. Por lo tanto, es recomendable que en futuros estudios que involucren el uso de *B. subtilis* en el follaje, se tengan en cuenta variables ambientales como temperatura, viento, lluvia, entre otros, que podrían afectar su efectividad en el cultivo. De esta manera, se podrá obtener una comprensión más completa de la influencia de las RPCV y optimizar su aplicación para lograr los mejores resultados agronómicos.
- Se sugiere llevar a cabo un nuevo estudio que explore la utilización de *B. subtilis* en conjunto con un cronograma de fumigación rotativa. Este enfoque permitiría evaluar los beneficios que los *B. subtilis* aporta al cultivo sin que este se vea significativamente afectado por la presencia de plaguicidas sintéticos. De esta manera, se busca encontrar una estrategia que combine lo mejor de ambos métodos, maximizando la protección de la planta contra plagas y enfermedades, mientras se minimiza el impacto negativo de los plaguicidas químicos en el ambiente y la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M. (2021). *Aislamiento e identificación de bacterias endófitas productoras de ácido indolacético a partir de plantas de lenteja de agua del género Spirodela* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/23781>
- Acosta, Y. (2008). *Diferente sistema de alimentación en cuyes (Cavia porcellus) de engorde con la utilización de insumos alimenticios producidos en la Selva Central* [Trabajo de Titulación, Universidad Nacional del Centro del Perú].
<https://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/2889?show=full>
- Alarcón, A. (2012). *Caracterización morfológica y molecular de colletotrichum spp. Asociadas a la antracnosis de lupinus mutabilis (chocho) y solanum betacea (tomate de árbol) en tres provincias del Ecuador*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/5286>
- Analuisa, I., García, S., & Paredes, P. (2020). Ensayo para medir el beneficio de la cadena de valor del chocho-Provincia de Cotopaxi. *FIPCAEC*, 5(5), 40–61.
<https://fipcaec.com/index.php/fipcaec/article/view/313>
- Arkhipova, T., Veselov, S., Melentiev, A., Martynenko, E., & Kudoyarova, G. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, 201–209.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-004-5047-x>
- Armijos, S. (2022, December 22). Harina y bebidas de chocho generan interés en el mercado internacional. *Vistazo*. <https://www.vistazo.com/enfoque/harina-y-bebidas-de-chocho-generan-interes-en-el-mercado-internacional-XA3929752>
- Bracho, K. (2019). *Efecto del pretratamiento de semillas con calor seco, para el control de antracnosis (Colletotrichum acutatum) y en el rendimiento de chocho (Lupinus mutabilis)* [Trabajo de Titulación,

- Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/15926>
- Caicedo, C., Murillo, A., Pinzón, J., Peralta, E., & Rivera, M. (2010). *INIAP-450 Andino: Variedad de chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2584>
- Calapaqui, K. (2022). *Evaluación del efecto de dos cepas de Bacillus subtilis en la promoción de crecimiento del cáñamo (Cannabis sativa L.) bajo condiciones de invernadero* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35898/1/IASA%20I-TT-0029.pdf>
- Chávez, M., & Vásquez, J. (2021). Efecto de la aplicación de tres dosis de Bacillus subtilis en tres variedades de fréjol arbustivo. *Siembra*, 8(2).
<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/SIEMBRA/article/view/2657/3702>
- Comisión Económica para América Latina [CEPAL] (1983). *Experiencia latinoamericana y el desafío campesino*.
https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/2658/S8391627_es.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Corrales, M. (2018). *Evaluación del efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por Bacillus subtilis Ctpx s2-1, en la inducción de expresión de genes de crecimiento y resistencia de lupinus mutabilis*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Américas].
<https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10259>
- Cusín, E. (2021). *Respuesta de dos genotipos de chocho (Lupinus mutabilis) a la aplicación de dos alternativas para el control de antracnosis (Colletotrichum acutatum) Calderón, Pichincha* [Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24878/1/T-IASA%20I-005708.pdf>
- Erazo, A. (2021). *Efecto de fertilización con Zn y Fe dopadas en nanopartículas sobre el rendimiento y calidad del grano*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26768/1/T-IASA%20I-004416.pdf>

Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmass, B., & Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture*, 13(7). <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/7/1279#:~:text=Rhizobia%20have%20been%20shown%20to,auxin%2C%20gibberellin%2C%20and%20cytokinin.>

Falconí, C. (2012). *Lupinus mutabilis* in Ecuador with special emphasis on anthracnose resistance [Tesis doctoral, Universidad de Wageningen]. <https://edepot.wur.nl/210228>

Falconí, C., Richard, G., & Van Heusden, A. (2013). Phenotypic, Molecular, and Pathological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Associated with Andean Lupine and Tamarillo in the Ecuadorian Andes. *The American Phytopathological Society (APS)*, 1–10.

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-02-12-0175-RE>

Falconí, C., & Yáñez, V. (2016). Dry heat treatment of Andean lupin seed to reduce anthracnose infection. *Crop Protection*, 89, 178–163.

[https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219416301788#:~:text=Highlights&text=Infested%20Andean%20lupin%20seed%20is,the%20anthracnose%20pathogen%2C%20Colletotrichum%20acutatum.&text=Dry%20heat%20\(65%20%C2%B0C,undetectable%20levels%20in%20four%20cultivars.&text=Dry%20heat%20from%2024%20to,of%20seed%20up%20to%2049%25.](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219416301788#:~:text=Highlights&text=Infested%20Andean%20lupin%20seed%20is,the%20anthracnose%20pathogen%2C%20Colletotrichum%20acutatum.&text=Dry%20heat%20(65%20%C2%B0C,undetectable%20levels%20in%20four%20cultivars.&text=Dry%20heat%20from%2024%20to,of%20seed%20up%20to%2049%25.)

Falconí, C., & Yáñez, V. (2018). Efficacy of UV-C radiation to reduce seedborne anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) from Andean lupin (*Lupinus mutabilis*). *Plant Pathology*, 67, 831–838.

<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ppa.12793>

Falconí, C., & Yáñez, V. (2019). Solar UV-B radiation limits seedborne anthracnose infection and induces physiological and biochemical responses in *Lupinus mutabilis*. *Plant Pathology*, 68, 1635–1644.

<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ppa.13086>

- 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.>
- 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>
- Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Analytical Biochemistry*, 1–7. <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20METODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACION%20DE%20PROTEINAS.pdf>
- Gordon, S., & Weber, R. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 26, 192–195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437633/>
- Guaranga, N., & Manobanda, D. (2022). *Estudio de factibilidad para la exportación de galletería con lupinus mutabilis hacia España 2021-2025*. [Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. <http://201.159.223.180/handle/3317/18182>
- Hauka, F., Moslam, T., Ghanem, K., & El-Shahat, M. (2016). Impact of Some Plant Growth Promoting Rhizobacteria" PGPR" on Organically Cultivated Spinach Plants (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 7(9), 235–240. https://jacb.journals.ekb.eg/article_41129_14f5d582f966b8d56a79e19c436ea321.pdf

- Hernández, Y., Rondón, A., & Fuentes, L. (2022). Microorganismos Rizosféricos con Potencialidades como Bioestimuladores y Biofertilizante. *Researchgate*.
https://www.researchgate.net/publication/360292126_MICROORGANISMOS_RIZOSFERICOS_CON_POTENCIALIDADES_COMO_BIOESTIMULADORES_Y_BIOFERTILIZANTES_IMPORTANCIA_DEL_GENE_RO_Bacillus
- 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* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26766/1/T-IASA%20I-004407.pdf>
- Jacobsen, S., & Mujica, A. (2006). El Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de Los Andes*, 28.
https://www.researchgate.net/publication/228615835_El_Tarwi_Lupinus_mutabilis_Sweet_y_sus_parientes_silvestres
- Jarrín, A. (2017). *Efecto de la radiación solar en infecciones de antracnosis (C. acutatum) en semilla y en el posterior rendimiento del chocho* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/13587>
- Kamnev, A., Shchelochkov, A., Perfiliev, Y., Tarantilis, P., & Polissiou, M. (2001). Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron(III). *Journal of Molecular Structure*, 565–572. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002228600000911X>
- Llerena, L. (2022). Beneficios del chocho para mejorar la nutrición. *Qualitas*, 24(24), 66–75.
<https://revistas.unibe.edu.ec/index.php/qualitas/article/view/149/271>
- Lloor, D. (2022). *Evaluación de dos cepas de Bacillus subtilis en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (Solanum betaceum) en etapa juvenil* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35901/1/IASA%20I-TT-0032.pdf>
- Márquez, C. (2020, July 15). 600 familias productoras de chochos lograron una certificación de buenas

prácticas agrícolas en esta pandemia. *El Comercio*.

<https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/chocho-union-familias-chimborazo-comercializacion.html>

Martínez, Y. (2005, May 4). La alimentación saludable y ‘para llevar’ se impone en el mercado global.

Tendencias. https://tendencias21.levante-emv.com/la-alimentacion-saludable-y-para-llevar-se-impone-en-el-mercado-global_a622.html

Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG] (2021). *Promueven cultivo de chocho en 95 hectáreas para*

2022, en Pichincha. [https://www.agricultura.gob.ec/promueven-cultivo-de-chocho-en-95-](https://www.agricultura.gob.ec/promueven-cultivo-de-chocho-en-95-hectareas-para-2022-en-pichincha/#:~:text=2022%2C%20en%20Pichincha-)

[hectareas-para-2022-en-pichincha/#:~:text=2022%2C%20en%20Pichincha-](https://www.agricultura.gob.ec/promueven-cultivo-de-chocho-en-95-hectareas-para-2022-en-pichincha/#:~:text=2022%2C%20en%20Pichincha-)

[,Promueven%20cultivo%20de%20chocho%20en%2095%20hect%C3%A1reas%20para%202022%2C%20en,cadena%20de%20valor%20del%20chocho%C2%BB.](https://www.agricultura.gob.ec/promueven-cultivo-de-chocho-en-95-hectareas-para-2022-en-pichincha/#:~:text=2022%2C%20en%20Pichincha-)

Mrkovacki, N., Mirjana, J., Djalovic, I., & Djordje, J. (2012). Importance of PGPR application and its effect on microbial activity in maize rhizosphere. *Researchgate*, 49(3), 335–344.

https://www.researchgate.net/publication/276229453_Importance_of_PGPR_application_and_its_effect_on_microbial_activity_in_maize_rhizosphere

Murillo, A., Peralta, E., Pinzón, J., & Rivera, M. (2002). *Evaluación de poblaciones F4 de fréjol arbustivo*

con resistencia a roya en Ecuador. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3168>

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol.

Trends Microbiol, 16(3), 115–125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18289856/>

Owen, D., Prysor, W., Griffith, G., & Withers, P. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase

agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41–54.

[https://www.researchgate.net/publication/267151240_Use_of_commercial_bio-](https://www.researchgate.net/publication/267151240_Use_of_commercial_bio-inoculants_to_increase_agricultural_production_through_improved_phosphorous_acquisition)

[inoculants_to_increase_agricultural_production_through_improved_phosphorous_acquisition](https://www.researchgate.net/publication/267151240_Use_of_commercial_bio-inoculants_to_increase_agricultural_production_through_improved_phosphorous_acquisition)

Palomeque, B., Moreno, A., Cano, P., & Álvarez, V. (2017). Inoculation of greenhouse tomato (*Solanum*

lycopersicum L.) cv. afrodita with plant growth-promoting rhizobacteria. *Terra Latinoamericana*, 35, 169–178.

https://www.researchgate.net/publication/321721081_Inoculation_of_greenhouse_tomato_Solanum_lycopersicum_L_cv_afrodita_with_plant_growth-promoting_rhizobacteria

Peralta, E. (2016). *El chocho en Ecuador “Estado de Arte.”*

<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3938/1/iniapscdpCD99.pdf>

Peralta, E., Murillo, A., Mazón, N., Villacrés, E., & Rivera, M. (2013). *Catálogo de variedades mejoradas de granos andinos: Chocho, quinua y amaranto, para la sierra de Ecuador.*

<https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2713>

Perrone, M. (2021). La inseguridad alimentaria en el Ecuador, analizada por la óptica de la FAO y los hallazgos del proyecto Siembra Desarrollo. *Rimisp*. <https://www.rimisp.org/noticia/la-inseguridad-alimentaria-en-el-ecuador-analizada-por-la-optica-de-la-fao-y-los-hallazgos-del-proyecto-siembra-desarrollo/>

Proaño, B. (2022). *Evaluación de células y sobrenadantes de Bacillus subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el crecimiento de arándano Vaccinium myrtillus var. Biloxi* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35906/1/IASA%20I-TT-0037.pdf>

Rahman, A., Sitepu, I., Tang, S.-Y., & Hashidoko, Y. (2010). Salkowski’s reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(11), 2202–2208. <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1271/bbb.100360?src=getftr>

Ron, A. (2022). *Respuesta agronómica y espectral del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) por efecto del pretratamiento de semilla con radiación solar UVB y la aplicación de Bacillus subtilis en los genotipos INIAP 450 - Andino y F3 (ECU 2658 x ECU 8415) en 3 estados fenológicos del cultivo*

[Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35908/1/IASA%20I-TT-0039.pdf>

Sánchez, E., Mejía, M., Díaz, A., Ramírez, A., Estrada, Y., & Valencia, A. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 5(2).

<https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405->

[31952016000200133&script=sci_arttext&tlng=en#aff1](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952016000200133&script=sci_arttext&tlng=en#aff1)

Sarango, J. (2017). *Evaluación del comportamiento de dos variedades (Andino y Guaranguito) de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) a cuatro densidades de siembra en el Sector Salache Bajo CAREN* [Trabajo de Titulación, Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/5233>

Sorokan, A., Veselova, S., Benkovskaya, G., & Maksimov, I. (2021). Endophytic Strain *Bacillus subtilis* 26D Increases Levels of Phytohormones and Repairs Growth of Potato Plants after Colorado Potato Beetle Damage. *Plants*, 10(5), 923. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8148200/>

Sorokan, A., Veselova, S., & Vladimirovich, I. (2021). Influence of *Bacillus subtilis* 26d on growth parameters and iaa content in potato plants infected with *Phytophthora infestans*. *Ekobioteh*, 4, 89–93.

https://www.researchgate.net/publication/354063243_INFLUENCE_OF_BACILLUS_SUBTILIS_26D_ON_GROWTH_PARAMETERS_AND_IAA_CONTENT_IN_POTATO_PLANTS_INFECTED_WITH_PHYTOPHTHORA_INFESTANS/citation/download

Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegovic, I., & Lazic, M. (2018). Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), 2–19.

https://www.researchgate.net/publication/323929011_Microbial_fertilizers_A_comprehensive_review_of_current_findings_and_future_perspectives/link/5b3e73d4a6fdcc8506f9706e/download

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*,

56(4), 845–847. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15853875/>

Tapia, M. (2015). *Tarwi, Lupino Andino: Tarwi, Tauri o Chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*.

<http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.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., & Kanaley, K. (2023). Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium. *Biological Control*, 185.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964423001597?via%3Dihub>

Yáñez, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280–289.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964411003276>

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