



Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática en plantas de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo de 3 meses

Molina Sotalín, Kate Micaela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César Eduardo, PhD.

30 de agosto del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática en plantas de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo de 3 meses**, fue realizado por la señorita: **Molina Sotalín, Kate Micaela**; 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 para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de agosto del 2023



Firmado digitalmente por:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

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

C.C. 0601556459

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



TESINA_UIC_MOLINA KATE.docx

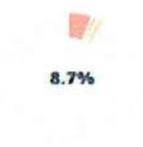
Scan details

Scan time:
August 30th, 2023 at 18:26 UTC

Total Pages:
48

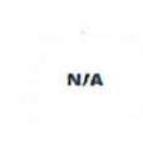
Total Words:
11854

Plagiarism Detection



| Types of plagiarism | | Words |
|---------------------|------|-------|
| Identical | 5.6% | 662 |
| Minor Changes | 1.1% | 129 |
| Paraphrased | 2% | 240 |
| Omitted words | 0% | 0 |

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text



firmado electrónicamente por:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

Ing. Falconí Saá, César Eduardo, PhD.

C.C. 0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Molina Sotalín, Kate Micaela**, con cédula de ciudadanía No.1725168775, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática en plantas de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo de 3 meses**, 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, 30 de agosto del 2023

.....
Molina Sotalín, Kate Micaela

C.C. 1725168775



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Molina Sotalín, Kate Micaela**, con cédula de ciudadanía No.1725168775 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática en plantas de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo de 3 meses** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de agosto del 2023

.....
Molina Sotalín, Kate Micaela

C.C. 1725168775

Dedicatoria

A mi madre Yesenia, quien cumple el rol de madre y padre al mismo tiempo, me ha educado con principios y valores mediante su amor, paciencia, esfuerzo y sabiduría, que han sido una pieza fundamental a lo largo de mi vida estudiantil y profesional, gracias por enseñarme a ser una mujer fuerte y perseverante.

A mis hermanos Andrés e Isaac por su incondicional apoyo y constantes consejos que me han motivado diariamente a esforzarme por ser mejor persona y profesional.

A mi abuela materna Rosa, quien con su sabiduría y consejos ha sido un gran apoyo en mi vida. Finalmente, a mi padre Sandhi, quien en vida fue un gran hombre, supo cuidarme y protegerme con amor, todo mi esfuerzo y trayecto se lo dedico para que se sienta orgulloso desde el cielo.

Agradecimiento

Primeramente, mi más sincero y profundo agradecimiento a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE y a la Carrera de Agropecuaria IASA-I, su personal docente y administrativo, por la ayuda y valiosos conocimientos impartidos en mi trayecto académico

Al Dr. César Falconí, por su tiempo, paciencia, predisposición y acompañamiento a lo largo del desarrollo de la presente investigación y por abrirme las puertas de su laboratorio llenos de enseñanza, práctica y aprendizaje que serán fundamentales para el desenvolvimiento profesional.

Al Ing. Darwin Claudio, por compartir sus conocimientos, consejos y guía en el desarrollo de mi proyecto de integración curricular que fueron de gran aporte para completar mi investigación y sobre todo por su amistad.

A mis compañeros y amigos de carrera; María José, Karent, José, Jefferson y Gretty por su amistad, apoyo y ayuda en este trabajo de investigación, además de compartir momentos de alegría y felicidad que serán recordadas para siempre.

Finalmente, un agradecimiento especial a Juan Diego, por su apoyo emocional y ánimo en todo momento para superar todo obstáculo que se presentará, gracias a la motivación incondicional para culminar con éxito este proyecto de investigación.

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 |
| Agradecimiento | 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 | 18 |
| Objetivo general..... | 18 |
| Objetivos específicos | 18 |
| Hipótesis | 18 |
| CAPÍTULO II | 20 |
| MARCO REFERENCIAL | 20 |
| Generalidades del tomate Cherry | 20 |
| Tomate amarillo en el mundo | 21 |
| Características del cultivo de tomate Cherry..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| Tallo..... | 22 |
| Hojas | 22 |
| Raíz | 22 |
| Flor | 23 |
| Frutos | 23 |
| Manejo del cultivo de tomate | 24 |
| Tutorado | 24 |
| Poda de formación..... | 24 |
| Poda de brotes | 25 |
| Poda de hojas o deshojado..... | 26 |
| Raleo de frutos | 26 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 26 |
| <i>Bacillus subtilis</i> rizobacteria promotora del crecimiento de plantas..... | 27 |
| Colonización de raíces | 28 |
| <i>B. subtilis</i> contribuye a la asimilación de nutrientes | 29 |
| Producción de hormonas vegetales..... | 30 |
| Fijación de nitrógeno | 31 |
| Solubilización de fósforo..... | 31 |
| CAPÍTULO III..... | 33 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| Ubicación y características del área de estudio | 33 |
| Fase de campo | 33 |
| Fase de laboratorio..... | 33 |
| Diseño experimental..... | 34 |
| Tratamientos | 34 |
| Modelo matemático | 35 |

| | |
|---|-----------|
| Croquis experimental..... | 35 |
| Métodos | 36 |
| Inoculación de <i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5 | 36 |
| Preparación de medios de cultivo y bancos de dilución | 37 |
| Cuantificación de placas | 37 |
| Variables a evaluar..... | 37 |
| Variables agronómicas | 37 |
| Altura de la planta | 37 |
| Índice de contenido de clorofila mediante el Fluorómetro de clorofila CCM-200 (Técnica no destructiva)..... | 38 |
| Variables de laboratorio | 38 |
| Índice de contenido de clorofila por espectrofotometría (Técnica destructiva) | 38 |
| Biomasa | 39 |
| Cuantificación de auxinas..... | 39 |
| Fijación de nitrógeno | 41 |
| Solubilización de fosfatos | 41 |
| CAPÍTULO IV | 42 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| Resultados | 42 |
| Altura | 42 |
| Índice de contenido de clorofila..... | 43 |
| Dinámica poblacional..... | 46 |
| Porcentaje de humedad..... | 46 |
| Contenido de auxinas | 48 |
| Fijación de nitrógeno..... | 49 |
| Solubilización de fosfatos | 49 |

| | |
|---|-----------|
| Discusión..... | 50 |
| CAPÍTULO V | 54 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 54 |
| Conclusiones..... | 54 |
| Recomendaciones..... | 55 |
| Bibliografía | 56 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 <i>Tratamientos para evaluar el efecto de inoculaciones de B. subtilis en parámetros agronómicos y fisiológicos de tomate cherry (Solanum lycopersicum var. cerasiforme)</i> | 35 |
| Tabla 2 <i>Elaboración de curva estándar de ácido indolacético.....</i> | 40 |
| Tabla 3 <i>Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en la altura (cm) de plantas de tomate Cherry</i> | 43 |
| Tabla 4 <i>Efecto de las aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el índice de contenido de clorofila en hojas de tomate Cherry</i> | 44 |
| Tabla 5 <i>Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el índice de contenido de clorofila (ug/ml) en hojas de tomate Cherry</i> | 45 |
| Tabla 6 <i>Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el porcentaje de humedad de órganos (raíz, tallo y hojas) de plantas de tomate Cherry a los 75 días después del trasplante.....</i> | 47 |
| Tabla 7 <i>Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el contenido de ácido indolacético (ug/ml) en raíces de tomate Cherry.....</i> | 48 |

Índice de figuras

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | <i>Forma de la hoja del tomate</i> | 22 |
| Figura 2 | <i>Floración del tomate</i> | 23 |
| Figura 3 | <i>Formas del tomate</i> | 24 |
| Figura 4 | <i>Esquemas de sistemas de conducción con uno y dos ejes.</i> | 25 |
| Figura 5 | <i>Plantas con brotes axilares</i> | 25 |
| Figura 6 | <i>Racimo de tomate en flor para raleo</i> | 26 |
| Figura 7 | <i>Inoculación a nivel de rizosfera en planta de tomate y los beneficios que ofrece Bacillus subtilis</i> | 29 |
| Figura 8 | <i>Ubicación del invernadero de Horticultura</i> | 33 |
| Figura 9 | <i>Ubicación de los laboratorios de Fitopatología y Control Biológico</i> | 34 |
| Figura 10 | <i>Croquis experimental</i> | 36 |
| Figura 11 | <i>Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en la altura (cm) de plantas de tomate Cherry a los 75 días después del trasplante</i> | 42 |
| Figura 12 | <i>Crecimiento de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la rizosfera de plantas de tomate Cherry, por efecto de inoculaciones periódicas</i> | 46 |
| Figura 13 | <i>Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el porcentaje de humedad de órganos (raíz, tallo y hojas) de plantas de tomate Cherry</i> | 47 |
| Figura 14 | <i>Contenido de auxinas en plantas de tomate Cherry por efecto de inoculaciones de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 luego de 75 días después del trasplante</i> | 48 |
| Figura 15 | <i>Crecimiento de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio libre de nitrógeno (Ashby manitol)</i> | 49 |
| Figura 16 | <i>Solubilización de fósforo de cepas de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5</i> | 50 |

Resumen

En la presente investigación se evaluó el efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis*, Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR) que fueron formuladas en un medio de bajo coste e inoculadas periódicamente en la rizosfera de plantas de tomate Cherry. Estos inóculos fueron aplicados en treinta y seis plantas bajo condiciones de invernadero, durante tres meses cada 15 días, para ello fueron distribuidas en tres tratamientos (T1: Células de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1; T2: Células de *B. subtilis* cepa CtpxS3-5) y un control (T0: agua destilada). Los tratamientos se establecieron en un Diseño Completamente al Azar, 12 unidades experimentales con tres repeticiones, cuatro macetas como unidad muestral. Las variables de estudio fueron altura de la planta, Índice de Contenido de Clorofila (ICC), dinámica población, biomasa, contenido de auxinas y acción enzimática. Las aplicaciones de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 indujeron valores más altos en variables agronómicas y crecimiento de bacteriano expresado en Unidades Formadoras de Colonias por gramos de suelo (UFC/g) comparado con la cepa CtpxS3-5. En cuanto a la cuantificación de auxinas y porcentaje de humedad en órganos de tomate Cherry se obtuvieron valores mayores en los tratamientos inoculados con las dos cepas de *B. subtilis* CtpxS3-5 y CtpxS2-1. Finalmente, las cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 tuvieron la capacidad de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y Solubilización de Fosfatos (SF), actividades que realizan mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas, con un efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal y en el aumento del potencial productivo.

Palabras clave: TOMATE CHERRY, *BACILLUS SUBTILIS*, INOCULACIÓN, RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)

Abstract

This research evaluated the effect of two strains of *Bacillus subtilis*, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), formulated in a low-cost medium and periodically inoculated in the rhizosphere of plants of Cherry tomatoes. These inoculants were applied to thirty-six plants under greenhouse conditions for three months, every 15 days. They were divided into three treatments (T1: *B. subtilis* strain CtpxS2-1 cells; T2: *B. subtilis* strain CtpxS3-5 cells) and a control (T0: distilled water). The treatments were established in a Completely Randomized Design (CRD), 12 experimental units with three replications, four pots per experimental unit. The studied variables included plant height, Chlorophyll Content Index (CCI), population dynamics, biomass, auxin content, and enzymatic activity. The applications of *B. subtilis* strain CtpxS2-1 cells induced higher values in agronomic variables and growth of Colony-Forming Units per grams (CFU/g) compared to the strain CtpxS3-5. Regarding the quantification of auxins and percentage of in Cherry tomato organs, higher values were obtained in the treatments inoculated with the two strains of *Bacillus subtilis* CtpxS3-5 and CtpxS2-1. Finally, the strains *B. subtilis* CtpxS2-1 and CtpxS3-5 had the capability for Biological Nitrogen Fixation (BNF) and Phosphate Solubilization (PS), activities carried out through enzymes like nitrogenases and phytases, with a positive effect on promoting plant growth and increasing potential productivity.

Keywords: CHERRY TOMATO, *BACILLUS SUBTILIS*, INOCULATION, PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El tomate es una de las hortalizas más productivas del mundo, por lo que su demanda ha crecido con el paso del tiempo y se ha convertido en una importante fuente de exportaciones agrícolas. De esta manera, se considera a *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (tomate "cherry") como el probable ancestro inmediato del tomate cultivado, cuya forma silvestre se extendió desde las regiones de Ecuador y Perú a lo largo de América Tropical (Fornaris, 2007).

Los microorganismos del suelo se han convertido en una herramienta clave para la producción agrícola, entre ellas Moreno *et al.* (2018) señalan las bacterias fijadoras de nitrógeno, que tienen la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes y elementos esenciales para las plantas, además de mejorar su crecimiento y desarrollo.

El uso de estos microorganismos ha crecido, principalmente porque representan una alternativa sustentable. Según, Corrales *et al.* (2017) los biofertilizantes pueden sustituir positivamente la fertilización química y brindar protección al medio ambiente a fin de incrementar el rendimiento de los cultivos. Un grupo de estas son las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, que además actúan como control biológico de enfermedades como mencionan según investigaciones pasadas (Álvarez *et al.*, 2014; Falconí *et al.*, 2022)

Según Hashem *et al.* (2019) *B. subtilis* es un género de interés agrícola, el cual actúa en la promoción de crecimiento vegetal, debido a los mecanismos de Resistencia Sistema Inducida (RSI) que poseen frente a bacterias y hongos patógenos. Asimismo, (Yáñez y Falconí, 2018, 2021) describen el potencial de biocontrol de *Bacillus*, en particular las cepas de *B. subtilis*, que se basa en la producción de una amplia gama de compuestos potentes, como enzimas

antifúngicas y lipopéptidos, entre ellos que se encuentran los lipopéptidos de las familias surfactina, iturina y fengicina.

Justificación

Bacillus subtilis ha sido considerada uno de los microorganismos que ha tenido un gran impacto en la agricultura y en el medio ambiente, ya que se ha demostrado su efectividad como promotora de crecimiento para abordar desafíos asociados con la producción de cultivos y una alternativa sostenible para minimizar la utilización de fertilizantes químicos.

En este sentido, Corrales *et al.* (2017) afirman el efecto beneficioso de las rizobacterias dentro de la biopelícula que protegen e impactan positivamente en la tolerancia del estrés externo, mejorando la fertilidad del suelo, mediante la fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fosfatos. Es el caso de *B. subtilis* una bacteria gram positiva que se encuentra en asociación con plantas epífitas presentes dentro la rizosfera, son las responsables de enormes niveles de producción de enzimas hidrolíticas como proteasas y amilasas. Estudios recientes realizados por Falconí y Yáñez (2022) han demostrado el eficiente efecto de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el control de enfermedades, dado por antibiosis, Yáñez y Falconí (2018) menciona también por inducción del sistema de resistencia y promoción de crecimiento vegetal (Yáñez y Falconí, 2021).

Por otro lado, el tomate Cherry es una hortaliza con gran protagonismo cuya producción y comercialización que se ha intensificado en los últimos años, ya que dispone de frutos de sabor dulzón, convirtiéndose en un ingrediente versátil en la gastronomía moderna (Pinho *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de toda su importancia económica y social, su producción aún tiene un costo muy alto, principalmente debido a la necesidad de grandes cantidades de fertilizantes y al mayor uso de pesticidas por ser altamente susceptible a plagas y enfermedades.

Este estudio tiene como finalidad evaluar el efecto de dos cepas exitosas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, formuladas en un medio de bajo coste según estudios (Yáñez *et al.*,

2012, 2023) e inoculadas periódicamente en la rizosfera de plantas hospederas de tomate Cherry, creando un microbioma favorable a través de la colonización de raíces, para aumentar la productividad del cultivo y adicionalmente se espera la promoción del crecimiento y mejora del estrés biótico de la planta.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento (altura, índice de clorofila, biomasa), producción de auxinas (ácido indolacético), y acción enzimática (fitasas y nitrogenasas) en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo de 3 meses.

Objetivos específicos

Determinar la promoción de crecimiento en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) por efecto de *B. subtilis* en un periodo de 3 meses.

Cuantificar el contenido de auxinas en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

Establecer la acción enzimática en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) por efecto de *Bacillus subtilis* en un periodo de 3 meses.

Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* presente en la rizosfera del cultivo cada 15 días durante 3 meses.

Hipótesis

HO: Las células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no actúan en la promoción de auxinas, actividad enzimática, ni en la inducción de crecimiento en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

H1: Las células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 actúan en la promoción de auxinas, actividad enzimática, ni en la inducción de crecimiento en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIAL

Generalidades del tomate Cherry

El género *Solanum* es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo, Saavedra (2020) menciona al botánico sueco Carl Linneaus (1707-1778) quien fue el primero en clasificar el género *Solanum*, como *Solanum lycopersicum*. De esta forma, el tomate *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, también conocido como “tomate cereza” se cree que es un cultivo intermediario entre *Solanum pimpinellifolium* L. y *S. lycopersicum* L, de los cuales el primero sería el ancestro silvestre más cercano del tomate.

Medina y Lobo (2001) mencionan que el cultivo de tomate es nativo de los climas tropicales y subtropicales de la costa oeste de América del sur, donde los españoles al llegar a América llevaron esta especie a Europa y fue reconocida como planta ornamental, hasta que conocieron sus cualidades culinarias y comenzaron a cultivarla como verdura (González, 2007). Por otro lado, desde una perspectiva evolutiva, el mejoramiento de tomate ha logrado un aumento significativo en el rendimiento y otras características productivas en poco tiempo, donde la domesticación y la selección artificial del tomate han provocado importantes cambios fisiológicos, reduciendo significativamente su diversidad genética (Pereira *et al.*, 2021). Según, Medina y Lobo (2001) la importancia de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* radica en su uso como fuente genética de tomates comestibles para su uso industrial y en el desarrollo de los tomates llamado tipo cereza de amplia aceptación, cuyo fruto se utiliza entero en ensaladas.

Se conoce, que el tomate Cherry es una planta perenne que se cultiva como planta anual en áreas menos cálidas. Las características morfológicas de esta planta son de tipo mata, con tallo erguido y ramificado (cuando los frutos crecen llegan a tumbar la planta), el cual está completamente cubierta por vellosidades; tiene una raíz primaria con una estructura muy ramificada; posee hojas alternas, compuestas, con márgenes dentadas y cubiertas de las

mismas vellosidades que los tallos; sus flores producen bayas globosas y carnosas en varias formas llamadas tomates, donde generalmente todas las especies silvestres poseen frutos muy pequeños y dentro de ellas semillas que se absorben en una pulpa bastante líquida, que tiene un sabor agradable (Warnock, 1988).

Tomate amarillo en el mundo

Se cree que México es el centro de domesticación del tomate debido a la mayor similitud entre las variedades europeas y las variedades silvestres de México, por lo que a partir de allí la planta se extendió por todo el continente americano y además también se introdujo en Europa en el siglo XVI (Zanfini *et al.*, 2017)

Actualmente, los tomates se cultivan en casi todos los países del mundo, por lo que existe una amplia variedad de tomate, es el caso del tomate pera que tuvo sus orígenes en Europa en el siglo XVIII y para el siglo siguiente fue introducido tanto en Inglaterra como Estados Unidos (Plantas y Flores, 2023). Existe un tipo de tomate cuyo fruto produce tomates amarillos pequeños y tienen forma de peras, es el conocido como tomate “pera amarilla”, el cual es una planta que crece con enredaderas bastante altas de hasta 8 pies de altura. Además de ser tomates deseables por su productividad y coloridos son excelentes para bocadillos y ensaladas (Fornaris, 2007).

Características del cultivo de tomate Cherry

El cultivo de tomate Cherry es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como planta anual y puede desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta (Infoagro, 2023). La altura varía en diferentes cultivares, siendo la altura mínima menos de 20 pulgadas y su altura máxima de 80 pulgadas o más. En cuanto a su tallo, el tallo principal logra alcanzar una altura de entre uno a dos pies, dependiendo del cultivar (Fornaris, 2007).

Tallo

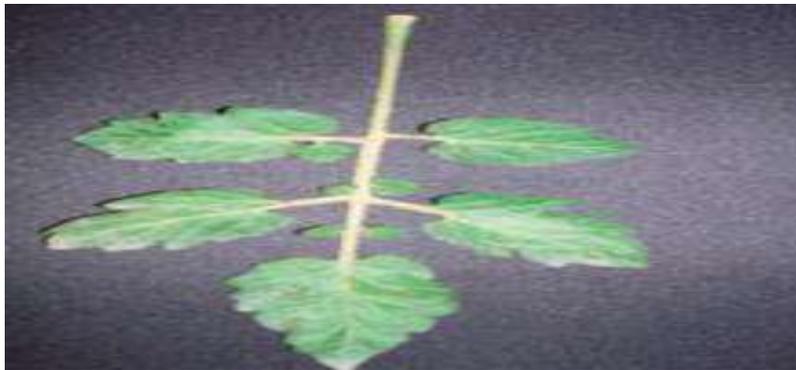
Los tallos, tanto principales como secundarios tienen un crecimiento bastante prominente, estos son sólidos y anchos, cubierta por pelos glandulares de color blanco. El tamaño se muestra inicialmente de dos maneras tanto rastroso como erecto así desarrollándose posteriormente un tanto postrado (Fornaris, 2007).

Hojas

La forma de sus hojas es pinnada y compuesta, con entre siete a nueve folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado, alternos y opuestos, es muy variable y su forma depende mayormente de las condiciones ambientales (Figura 1). En cuanto a su lámina tiene un largo de 6 a 12 pulgadas y está dividida entre pares de segmentos o folíolos de tamaños diferentes. Las hojas mayormente dentadas y frecuentemente rizadas, pero también suelen ser lisas, (Saavedra, 2020).

Figura 1

Forma de la hoja del tomate



Nota. Hoja pinnada y compuesta de color verde, glanduloso y pubescente por el haz y ceniciento por el envés. Recuperado de (López, 2017)

Raíz

La raíz de la planta de tomate es pivotante fuerte, sin embargo, con frecuencia se ve afectada en el procedimiento de producción de plántulas para trasplante. Las raíces logran alcanzar más de 48 pulgadas en siembra directa. En óptimos casos donde son las condiciones

de suelo le son bien favorables para el desarrollo, logran alcanzar 120 pulgadas. Sus raíces logran alcanzar un radio de 60 pulgadas, donde la raíz principal forma un sistema denso de raíces laterales fibrosas (Fornaris, 2007).

Por otro lado, cuando se sigue la siembra de trasplantes la planta genera un sistema de raíces que se concentran en las primeras ocho a diez pulgadas del suelo. Este fenómeno suele ocurrir también cuando el riego es realizado con mucha frecuencia o también debido a que el agua no logra penetrar a profundidad es decir cuando el agua alcanza poca profundidad. Debido a estos fenómenos la planta puede desarrollar raíces adventicias de los nudos inferiores y de las ramas principales (Pinho *et al.*, 2011).

Flor

Las flores en la planta de tomate son amarillas, agrupadas en inflorescencias de tipo racimo y se ubican en las axilas, cada dos o tres hojas (Figura 2). Por lo general, la primera flor se desarrolla en la yema apical, mientras que las demás aparecen en posición lateral y debajo de la primera flor, siempre colocándose alrededor del eje principal (López, 2017).

Figura 2

Floración del tomate



Nota. Proceso de floración de tomate e inflorescencia tipo racimo. Recuperado de (Meza *et al.* 2013)

Frutos

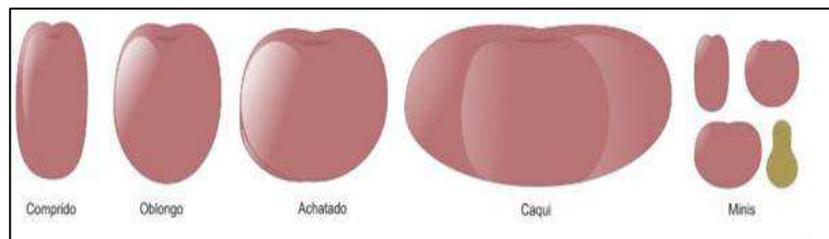
Los frutos son bayas esféricas, de color amarillo, rosa o rojo debido a las diferentes proporciones de licopeno y caroteno (Fornaris, 2007). Puede ser redonda, plana o en forma de pera, de superficie lisa o achatada, y su tamaño varía según la variedad (Figura 3). Tiene un

peso de 5 a 500 gramos dependiendo de la variedad (el peso medio de los frutos obtenidos en tomate Cherry es de 10-25 gramos) y las condiciones de desarrollo (Saavedra, 2020).

Además, los frutos están unidos a la planta por un pedúnculo, que tiene una parte articulada engrosada que contiene la capa de abscisión. Los frutos maduros están formados por el pericarpio, tejido placentario y semillas (Meza *et al.*, 2013).

Figura 3

Formas del tomate



Nota. Presentación de diferentes formas, tamaño, consistencia y composición del tomate. Recuperado de (Jaramillo *et al.*, 2007)

Manejo del cultivo de tomate

Tutorado

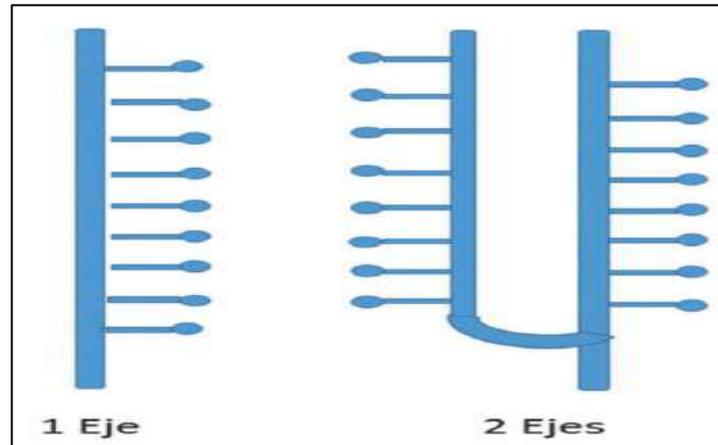
El tomate es un cultivo con indeterminado crecimiento, por ello debe ser guiado con la ayuda de un tutorado en su etapa de crecimiento, por ello, esta práctica se debe realizarse de quince a veintidós días posteriores al trasplante, que facilitará el manejo y aireación del cultivo (Jaramillo *et al.*, 2007). Además, el crecimiento de la planta dependerá del nivel productivo del cultivo, el cual será deteniendo a través del despunte (Guzmán *et al.*, 2017).

Poda de formación

Esta práctica es importante para el crecimiento de la planta, ya que se produce un aumento considerable de la biomasa aérea, por lo cual se permite eliminar los uno, dos o tres ejes de los tallos de la planta (Figura 4), para el caso de tomates Cherry suelen dejar de tres a cuatro ejes (López, 2017). Esto se realiza después de veinte o treinta días después del trasplante.

Figura 4

Esquemas de sistemas de conducción con uno y dos ejes.



Nota. Representación gráfica del manejo de formación de planta de tomate con 1 eje y con 2 ejes. Recuperado de (Guzmán *et al.*, 2017).

Poda de brotes

Esta práctica consiste en eliminar los brotes axilares o secundarios a lo largo de la planta, para mantener la arquitectura y el desarrollo de la planta (Figura 5). Este manejo se realiza periódicamente a durante todo el cultivo y se utilizan junto con la aplicación de un fungicida-bactericida para evitar la entrada de patógenos a las plantas (Guzmán *et al.*, 2017).

Figura 5

Plantas con brotes axilares



Nota. (A) Plantas con brotes axilares. (B) Planta con brotes extraídos. Recuperado de (Guzmán *et al.*, 2017).

Poda de hojas o deshojado

Es el proceso de eliminar las hojas inferiores viejas o enfermas, con el fin de facilitar la ventilación y disminuir la humedad relativa, además de las fuentes de inóculos de patógenos en las plantas. Debe evitarse la eliminación de más de tres hojas por encima del cuajado, ya que las plantas pueden estresarse (Meza *et al.*, 2013).

Este manejo requiere realizarlo en horas de la tarde con temperaturas entre 20 a 25°C y humedad bajo el 50% para disminuir la propagación de enfermedades por ingreso a través del corte (Quirós, 2016).

Raleo de frutos

Los brotes logran producir grandes cantidades de flores y frutos que no crezcan, ya que produce cierta competencia entre ellos. Para ello, este manejo consiste en retirar una gran cantidad de ramas, permitiendo un mejor desarrollo y comercialización (Figura 6) (Guzmán *et al.*, 2017).

Figura 6

Racimo de tomate en flor para raleo



Nota. Selección de flores menos vigorosas para raleo. Recuperado de (Guzmán *et al.*, 2017)

Bacillus subtilis

B. subtilis es una bacteria gram positiva, que habita de forma endémica en el suelo, que se ha convertido en la especie más estudiada del género *Bacillus* debido a su capacidad de formar una resistente endospora protectora, permitiendo tolerar condiciones ambientales

extremas (Hashem *et al.*, 2019). Además, *B. subtilis* puede aislarse de diversos entornos, desde el suelo hasta los hábitats marinos, y utilizarse en diversas aplicaciones, desde la producción de enzimas y la fermentación de alimentos hasta el control biológico de plantas (Yáñez y Falconí, 2018).

Por otro lado, (Sánchez, 2016) menciona que esta rizobacteria es un modelo para estudiar el desarrollo de biopelículas, la unión a las raíces de las plantas o a las hifas de los hongos, la producción de metabolitos secundarios, el intercambio de citoplasma a través de nanotubos intercelulares, entre otros, que han sido objeto de investigación en la actualidad, con el fin de contribuir positivamente en la producción agrícola.

***Bacillus subtilis* rizobacteria promotora del crecimiento de plantas**

Yáñez y Falconí (2021) mencionan que *B. subtilis* es una bacteria Gram positiva que habita en la rizosfera del suelo, la cual tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos (Anguiano *et al.*, 2019). Sin embargo, no existe pruebas suficientes de que todas las cepas de *B. subtilis* tengan el mismo efecto promotor de crecimiento, aunque si de producir metabolitos promotores de crecimiento en diferentes concentraciones. Además, ha demostrado ser un excelente regulador en la expresión de genes involucrados en el crecimiento y desarrollo vegetal (Yáñez y Falconí, 2021), donde su papel varía de acuerdo a los cambios ambientales que alteran la expresión génica del organismo (Moreno *et al.*, 2018). De acuerdo con Molina *et al.* (2015) generalmente el efecto de la producción de sustancias promotoras de crecimiento es efectivo en bajas concentraciones.

Por otro lado, Moreno *et al.* (2018) indica que estas bacterias asociadas a la rizosfera también son capaces de producir fitohormonas como auxinas y giberelinas, las cuales influyen positivamente en el crecimiento vegetal de las plantas como un mecanismo directo, al igual que otros de sus mecanismos como fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, vitaminas y

enzimas, la solubilización de fósforo inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, incremento de la permeabilidad de las raíces, entre otros.

Colonización de raíces

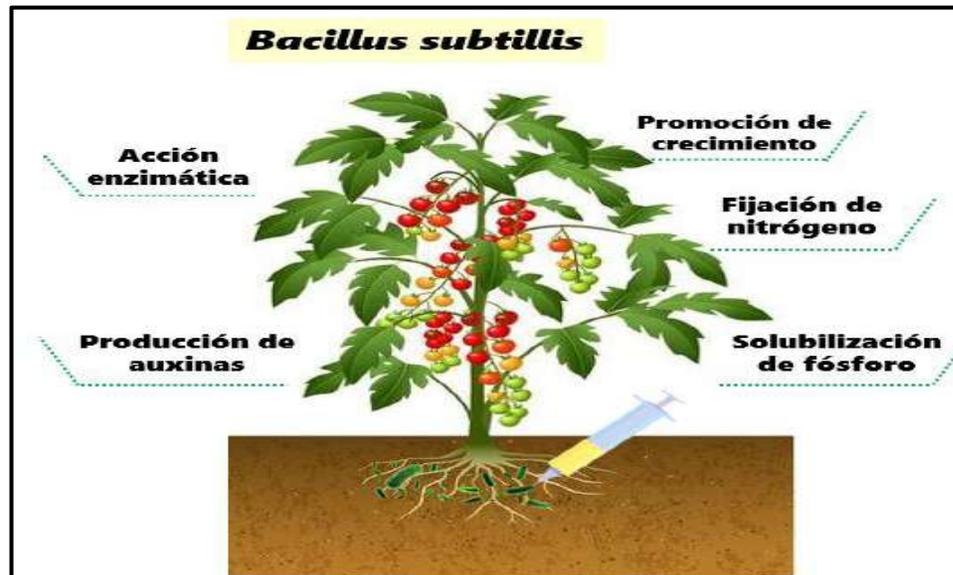
Un paso importante para el control biológico efectivo y el crecimiento favorable de las plantas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal es, sin duda, la colonización de sus raíces, de hecho Nihorimbere *et al.* (2011) manifiesta que los elementos esenciales para una colonización eficaz incluyen la capacidad del microorganismo para: sobrevivir después de la inoculación; crecer en la cubierta de la semilla (el área alrededor de la semilla) en respuesta al exudado producido por la semilla; asentarse en la superficie de la primera raíz; colonizar todo el sistema radicular.

Adriano *et al.* (2011) señala que cuando estos biofertilizantes se aplican a las semillas, superficies vegetales o suelo, colonizan la rizosfera o interior de las plantas y favorecen su crecimiento, así como también promueven el desarrollo de los mecanismos de defensa de las plantas. Esta colonización de microorganismos bacterianos a nivel radicular está relacionada con la concentración y composición de los exudados de las raíces, los cuales también influyen en la colonización, porque contienen diferentes tipos de ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos que sirven de alimento para la mayoría de las bacterias que habitan la rizosfera (Mahmood *et al.*, 2016). Según Zhang *et al.* (2019), esta quimiotaxis permite promover la multiplicación y colonización bacteriana, pero cuando es limitada, reduce la colonización de las raíces.

De esta manera, la inoculación y colonización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal ha generado excelentes resultados en la mejora del crecimiento y la productividad de diferentes cultivos, tal es el caso de *B. subtilis* una bacteria gram positiva capaz de generar varios mecanismos beneficiosos para las plantas como fijación de nitrógeno, inhibición de la síntesis de etileno, síntesis de hormonas vegetales, la solubilización de nutrientes como fósforo, hierro y potasio, entre otros (Figura 7) (Vásconez *et al.*, 2020).

Figura 7

Inoculación a nivel de rizosfera en planta de tomate y los beneficios que ofrece *Bacillus subtilis*



Nota. Representación esquemática de los beneficios que aporta *Bacillus subtilis* a las plantas. Adaptado a (Moreno *et al.*, 2018).

***B. subtilis* contribuye a la asimilación de nutrientes**

La nutrición es uno de los factores con gran importancia en el manejo de las plantas, esto se debe a que los cultivos requieren un nivel adecuado de nutrientes debido a su rendimiento por unidad de superficie (Chailleux *et al.*, 2014) Sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes ha ocasionado una amenaza para el medio ambiente y la salud de la humanidad, por ello se han desarrollado nuevas tecnologías con un enfoque de sostenibilidad de los sistemas productivos mediante el uso de microorganismos con propiedades biofertilizantes, como una práctica innovadora y promisoría en las actividades agrícolas (Singh y Nehra, 2011). Es caso de *B. subtilis* que tiene un efecto promotor de crecimiento al igual que ciertos mecanismos directos, entre los más importantes como biofertilizantes fijando biológicamente el nitrógeno y solubilizando fosfatos (Corrales *et al.*, 2017).

Además, el uso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizante es una opción sostenible que beneficia la disponibilidad de nutrientes, el

crecimiento de las plantas y su rendimiento, por los elementos inherentes a la interacción entre las rizobacterias y las especies vegetales, centrándose en sus efectos sobre los cultivos a través del sistema radicular (Moreno *et al.*, 2018).

De esta manera, *B. subtilis* se ha convertido en modelo de estudio e investigación por sus beneficios positivos como biofertilizantes y como agente biológico de gran capacidad, es así como su efecto se ha evidenciado en cultivos como arroz, papa, *Arabidopsis thaliana*, lechuga, maíz, tomate, banano, etc, generando una alternativa practica para la formulación para las aplicaciones en los cultivos (Sánchez, 2016). Según Sarmiento *et al.* (2013) esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas.

Producción de hormonas vegetales

Según (Gutierrez y Probanza, 2000), *B. subtilis* tiene la capacidad de sintetizar mecanismos de acción de dos distintas maneras, por un lado, están los mecanismos indirectos, que se centran en el control biológico de las enfermedades en las plantas, mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad microbiana, inhibiendo el desarrollo de ciertos fitopatógenos. Por otro lado, los mecanismos directos, que ayudan en la nutrición vegetal y el potencial promotor de crecimiento por acción de las fitohormonas producidas por estas bacterias (Swarnalakshmi *et al.*, 2020).

Estos microorganismos capaces de promover el crecimiento de las plantas, también pueden inducir el crecimiento vegetal directa e indirectamente, en la cual la influencia directa incluye la producción de fitohormonas, que incluyen ácido indolacético (AIA) del grupo de las auxinas, ácido giberélico (GA_3), citoquininas y ácido abscísico (ABA). Además, los mecanismos directos incluyen la liberación de fosfatos micronutrientes y la fijación biológica de nitrógeno (Angulo *et al.*, 2014).

De esta forma, González *et al.* (2022) afirma la capacidad de *B. subtilis* al secretar ácido indolacético y citoquininas, donde especialmente el ácido indolacético juega un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento de las plantas, además que protegen al hospedero contra los estímulos ambientales (Khan *et al.*, 2016). Asimismo, estudios recientes muestra que estas estas bacterias utilizan al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis de ácido indolacético, siendo estas tres vías (i) del ácido indol-3-pirúvico, (ii) de la indol-3-acetamida y (iii) del indol-3-acetonitrilo.

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los principales nutrientes de las plantas, siendo un factor limitante en el crecimiento de éstas y, como consecuencia, en los ecosistemas de explotación de la agricultura. De tal manera, Hashem *et al.* (2019) afirma que al inocular *B. subtilis*, estas aumentan su longitud y grosor proporcionalmente debido a que las bacterias que se asocian a la raíz producen fitohormonas como ácido indolacético, e incrementan la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Khan *et al.*, 2016). Esto se comparó con los resultados obtenidos en la investigación de (Moreno *et al.*, 2018), donde se obtuvo un 13,7 % más de crecimiento foliar en comparación con las plantas testigo para la especie brócoli.

Por ello, dependiendo de que esta fijación de nitrógeno sea independientemente simbiótica o no, se ha demostrado mediante varios estudios que al añadir *B. subtilis* a los cultivos vegetales, se aumentan notablemente la cantidad de nitrógeno disponible, así como los rendimientos de las plantas (Moreno *et al.*, 2018).

Solubilización de fósforo

Además del nitrógeno, otro de los nutrientes principales en las plantas es el fósforo que en los suelos pueden contener grandes reservas de fósforo total, pero la cantidad disponible para las plantas suele ser una pequeña proporción de éste. Por ello, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de solubilizar el fosfato poniéndolo a

disposición de la planta y dándole ventaja frente a todas las plantas que carecen de microbiota capaz de solubilizar este elemento (Chandrasekaran y Chun, 2016).

Es así que *B. subtilis* solubilizan el fosfato mediante diferentes mecanismos para convertir las formas insolubles de fósforo en formas solubles, además que utilizan los azúcares que toman de los exudados de las raíces de las plantas, lo metabolizan y liberan ácidos orgánicos como el ácido butírico, oxálico, succínico, málico, glucónico, acético, láctico, cítrico, entre otros, que actúan como buenos quelantes de los cationes de calcio (Ca^{2+} principalmente, aunque también hierro (Fe) aluminio (Al) y magnesio (Mg)) que acompañan a la liberación de fosfatos a partir de compuestos fosfáticos insolubles (Nihorimbere *et al.*, 2011)

Por otro lado, esta obtención de fosfatos se genera mediante unas enzimas producidas por determinados tipos de bacterias, conocidas como fosfatasas. Estas enzimas son capaces de solubilizar mediante hidrólisis el fósforo orgánico procedente de materia orgánica. De todas las fosfatasas cabe destacar las fitasas, capaces de hidrolizar el hexafosfato de inositol o fitato, que constituye alrededor de un 80% del total de formas en que podemos encontrar el fósforo orgánico (Ho *et al.*, 2012).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y características del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Carrera Agropecuaria IASA I, Hacienda “El Prado” de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, ubicada en el barrio San Fernando, geográficamente se encuentra a una altitud de 2748 msnm, en las coordenadas Latitud: 0°, 23, 27” S y Longitud: 78°, 24’, 47” O.

Fase de campo

La fase de campo de este estudio se llevó a cabo en el invernadero de Horticultura de la Carrera Agropecuaria IASA I, Hacienda “El Prado” ubicada en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha (Figura 8).

Figura 8

Ubicación del invernadero de Horticultura



Nota. Representación de la ubicación del invernadero de Horticultura donde se realizó el estudio, realizado en el software Google Earth. Autoría propia.

Fase de laboratorio

La fase de laboratorio de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera Agropecuaria IASA I, Hacienda “El Prado” ubicada en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha (Figura 9).

Figura 9

Ubicación de los laboratorios de Fitopatología y Control Biológico



Nota. Representación de la ubicación los laboratorios de Fitopatología donde se realizó el estudio, realizado en el software Google Earth. Autoría propia.

Diseño experimental

Se evaluó la respuesta de plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) a inoculaciones periódicas de dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en condiciones de invernadero.

Se estableció un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos, cada tratamiento tiene tres repeticiones, en la cual una unidad experimental está compuesta por cuatro macetas como unidad muestral (Tabla 1).

Tratamientos

Los tratamientos que se evaluó se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tratamientos para evaluar el efecto de inoculaciones de B. subtilis en parámetros agronómicos y fisiológicos de tomate cherry (Solanum lycopersicum var. cerasiforme)

| Tratamientos | Características |
|---------------------|--|
| T1 | 12 plantas de tomate Cherry inoculadas con células de <i>Bacillus subtilis</i> cepa CtpxS2-1 |
| T2 | 12 plantas de tomate Cherry inoculadas con células de <i>Bacillus subtilis</i> cepa CtpxS3-5 |
| T0 (control) | 12 plantas de tomate Cherry inoculadas con agua destilada |

Nota. Autoría propia

Las variables se analizaron mediante estadística descriptiva (media desviación estándar y coeficiente de variación) para determinar el efecto de las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* sobre las variables dependientes se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Además, los supuestos del análisis de varianza fueron evaluados a través de la prueba de comparación de medias de Tukey al 5%.

Modelo matemático

El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ij} = u + C_i + E_{ij}$$

Donde;

Y_{ij} = Crecimiento de las plantas de tomate cherry

u = Media general

C_i = Efecto de la i – ésima cepa de *Bacillus subtilis*

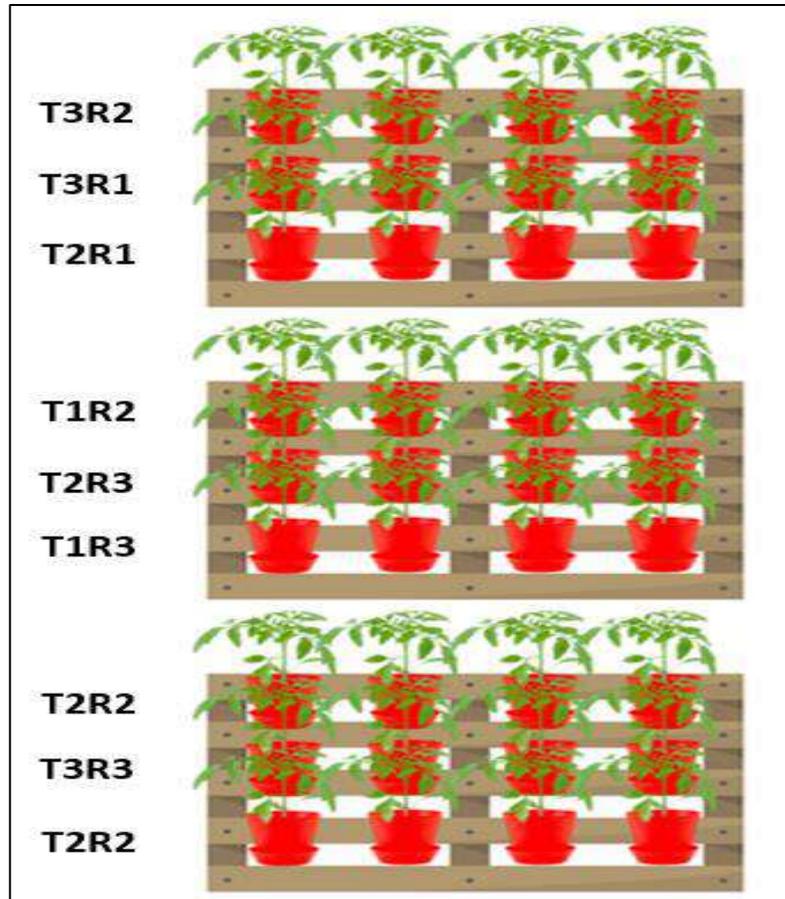
E_{ij} = Error experimental

Croquis experimental

El croquis para este diseño se muestra en la Figura 10..

Figura 10

Croquis experimental



Nota. Croquis experimental y aleatoria de los tres tratamientos con sus repeticiones T1: *B. subtilis* CtpxS2-1, T2: *B. subtilis* CtpxS3-5, T3: Agua destilada

Métodos

Inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

La inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 se realizó en la rizosfera de cada planta de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. La suspensión fue aplicada directamente en la rizosfera de la planta a razón de 50 ml por cada planta, cada 15 días durante tres meses.

Al segundo día, posterior a cada inoculación se recolectaron muestras de 1 g de suelo de cada maceta, con la ayuda de un barreno, para cuantificar la dinámica de la población en la

rizosfera de cada planta, utilizando el método de dilución y planteo (Falconí *et al.*, 2022). El mismo procedimiento se repitió cada 15 días.

Preparación de medios de cultivo y bancos de dilución

Para el plateo, se utilizaron medio Agar Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDA) (8 g/l de caldo nutritivo, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l dextrosa y 15 g/l de agar) para conteo y establecimiento de las concentraciones de inóculo y caldo Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDB) para la preparación de fermento de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5.

Se prepararon bancos de dilución con 9 ml de agua destilada en tubos de ensayo. Para realizar la primera dilución 10^{-1} , se tomaron 9 ml de agua destilada en un tubo de ensayo y se añadió una muestra de 1 g de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5. Posteriormente, se realizaron las siguientes diluciones seriadas hasta obtener diluciones que satisfagan los criterios de cuantificación de las poblaciones de *B. subtilis* tomando como referencia la dilución 10^{-2} (Falconí *et al.*, 2022).

Cuantificación de placas

Las poblaciones viables de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 se cuantificaron mediante cajas Petri con medio agar nutritivo dextrosa para levaduras y se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Cada dilución seriada se sembró con 100 μ L, rastrillado sobre el medio, además cada dilución se sembró por duplicado y se incubó por 24 horas a 30°C. Para la cuantificación de poblaciones se seleccionaron aquellas placas que tuvieron entre 25 y 250 colonias.

Variables a evaluar

Variables agronómicas

Altura de la planta

La altura se midió con un flexómetro desde la base de la planta hasta el centro de la parte apical de la planta, con el fin de aminorar la variabilidad al momento de la recolección de

muestras de suelo no varíe. Este procedimiento se realizó cada 15 días, después de 3 días de cada inoculación.

Índice de contenido de clorofila mediante el Fluorómetro de clorofila CCM-200 (Técnica no destructiva)

La determinación de clorofila se utilizó una primera técnica que cuantificó el contenido de clorofila cada 15 días, después de 3 días de cada inoculación, en 3 folíolos de las hojas de tomate Cherry, mediante el Fluorómetro de clorofila CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Science).

Variables de laboratorio

Índice de contenido de clorofila por espectrofotometría (Técnica destructiva)

Para la determinación de clorofila por espectrofotometría se realizó de acuerdo al método de Arnon (1949), para lo cual se pesó 2,5 g de la hoja fresca, la cual se maceró en un tubo de ensayo adicionando 5 mL de acetona al 80%, junto con carbonato de calcio al 1% (v/v). para evitar la degradación del carbonato de calcio, hasta extraer todo el colorante de la muestra, posteriormente se dejó a refrigeración a 9°C durante 24 horas.

El extracto de la muestra se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min, esta operación se repitió hasta que el color verde fue eliminado por completo a partir del residuo, se separó 1 ml del sobrenadante que contiene los pigmentos y se midió la absorbancia de esta solución en un espectrofotómetro a 663 nm y 645 nm para determinar clorofila a y b, respectivamente, utilizando una muestra de acetona al 80% como blanco. Por último, se determinaron las variables de clorofila a y b con las ecuaciones presentadas, a continuación:

$$\text{Clorofila total} = (8,02 * A_{663}) + (20,21 * A_{645}) \quad Ec \quad [1]$$

$$\text{Clorofila a} = (12,7 * A_{663}) - (2,69 * A_{645}) \quad Ec \quad [2]$$

$$\text{Clorofila b} = (22,9 * A_{645}) + (4,68 * A_{663}) \quad Ec \quad [3]$$

Biomasa

La acumulación de biomasa se determinó en diferentes órganos de la planta (hojas, tallo, raíz y fruto) al término de los 82 días, una semana después de la última inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5.

Para ello se realizó un muestreo destructivo de 3 plantas representativas por tratamiento, los cuales para la materia fresca se pesaron los diferentes órganos de la planta por separado en una balanza analítica (González *et al.*, 2018), mientras que para la materia seca los mismos órganos fueron sometidos a un secado en estufa a temperatura constante de 95°C durante 24 horas; se tomó el dato de materia seca con balanza electrónica (Velasco *et al.*, 2016).

El método para la obtención del porcentaje de humedad se basa en el secado de una muestra en un horno y su determinación por la diferencia entre el peso del material seco y el material vegetal húmedo mediante la siguiente ecuación (López *et al.*, 2013).

$$\%Humedad = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad Ec \quad [4]$$

Donde:

P_i= Peso inicial

P_f= Peso final

Cuantificación de auxinas

La determinación de producción de ácido indolacético se llevó a cabo por el método calorimétrico, utilizando el reactivo de Salkowski preparado de la siguiente manera: 15 mL de H₂SO₄, 25 mL de agua destilada, 0,75 mL de FeCl₃·6H₂O (0,5 M) (Gordon y Weber, 1950). Este reactivo se utiliza para la detección del grupo indol y tiene como principio la oxidación que produce el ácido perclórico sobre estas moléculas, generando una coloración de la gama rosada a fucsia. Esto indica la presencia de moléculas con grupo aromático indol, relacionado

estrechamente con la presencia de compuestos auxínicos en la muestra analizada (Glickmann y Dessaux, 1995).

Se elabora una curva estándar de ácido indolacético, la cual se prepara mediante soluciones estándar con concentraciones de 0, 2, 4, 8, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ a partir de una solución madre de 1 mg/mL de ácido indolacético. Con las soluciones preparadas se construyó la curva de calibración de ácido indolacético midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm usando un espectrofotómetro (Celis y Gallardo, 2008). Los valores de la curva de calibración de ácido indolacético obtenida se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Elaboración de curva estándar de ácido indolacético

| Solución madre | | Curva estándar | |
|--|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Volumen solución madre (μL) | Volumen de agua (μL) | [AIA] ($\mu\text{g/ml}$) | Lecturas de absorbancia |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 995 | 5 | 0,091 |
| 10 | 990 | 10 | 0,179 |
| 15 | 985 | 15 | 0,275 |
| 20 | 980 | 20 | 0,359 |
| 25 | 975 | 25 | 0,435 |
| 30 | 970 | 30 | 0,518 |

Nota. Curva de calibración de ácido indolacético para la cuantificación bajo el método de Salkowsky. Recuperado de (Glickmann y Dessaux, 1995).

Para este ensayo, se utilizaron muestras de raíces de plantas de tomate Cherry, previamente lavadas con agua destilada, las cuales fueron colectadas en fundas negras para evitar la exposición de luz, ya que la concentración de auxinas puede degradarse. Se pesó 1 g de muestra de raíz y colocó en tubos Falcon recubiertos con papel aluminio, previamente rotulados. A continuación, se añadió 5 ml de extracto de acetona (80%) y dejó reposar en refrigeradora a -4°C por 24 horas para ayudar a la extracción de ácido indolacético.

Transcurrido el tiempo, las muestras fueron molidas en un mortero. Se marcaron tubos de ensayo y se transfirió el extracto de la muestra a estos tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio, previamente rotulados. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 500 rpm durante 10 min. Luego, se colocó 1 mL de sobrenadante en un tubo de ensayo con papel aluminio y adicionó 3 ml del reactivo de Salkowski, dejándolo reposar durante 30 min, sin exponer las muestras a la luz. Finalmente, se colocó 1 mL en cada celda por muestra para leer en el espectrofotómetro a una absorbancia a 530 nm (Celis y Gallardo, 2008).

Fijación de nitrógeno

Para la detección de la capacidad fijadora de nitrógeno en placa, se utilizó un medio libre de nitrógeno (medio Ashby), medianamente selectivo para bacterias fijadoras, que permite el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. Las cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 obtenidas del sustrato para dinámica poblacional se sembraron en agar Ashby Manitol (Manitol 15 g/L; K_2HPO_4 0,3 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/L; NaCl 0,3 g/L; $CaCO_3$ 7,5 g/L; agar-agar 18 g/L; pH 7,2) y se incubó por 5 días a 32°C (Sarmiento *et al.*, 2013).

Solubilización de fosfatos

Para determinar si las bacterias solubilizan fosfato, las cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 obtenidas del sustrato para dinámica poblacional, se sembraron en medio de agar Pikovskaya, que contiene (por litro): 0,5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa, 5 g de $Ca_3(PO_4)_2$, 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de KCl, 0,1 g de $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,0001 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,0001 g de $FeSO_4 \times 7H_2O$ y 15 g de agar (Hernández *et al.*, 2011). Se incubaron a 28°C durante 5 días. Las cepas produjeron un halo amarillo alrededor de las colonias se consideraron positivas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

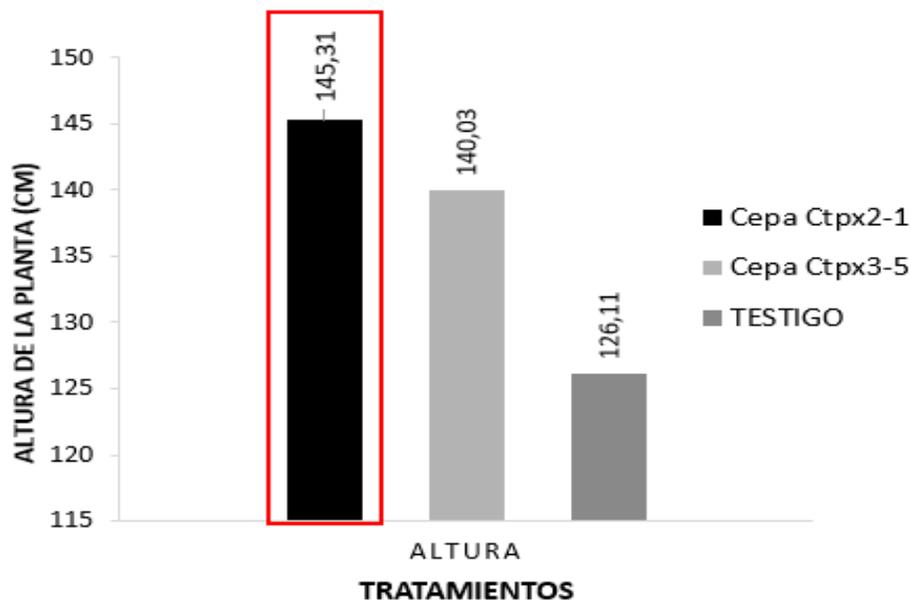
Resultados

Altura

En la Tabla 3, se muestra que las plantas de tomate Cherry alcanzaron una tendencia progresiva, a pesar que no mostraron diferencias significativas para su altura hasta los 15 días después del trasplante (DDT). Sin embargo, a partir los 30 días después del trasplante, se evidenciaron diferencias significativas para la altura de las plantas que recibieron las cepas de *B. subtilis* en comparación con el testigo. Finalmente, en la última inoculación, al día 75, la tasa de crecimiento presentó diferencias significativas entre tratamientos ($F(2;6) = 1813,17$; $p < 0,0001$). Las plantas que recibieron del *B. subtilis* CtpxS2-1 presentaron la mayor altura con una media de 145,31 cm (Figura 13), en comparación con los demás tratamientos.

Figura 11

Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en la altura (cm) de plantas de tomate Cherry a los 75 días después del trasplante



Nota. Autoría propia

Tabla 3

Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en la altura (cm) de plantas de tomate Cherry

| TRATAMIENTO | 0 DDT | 15 DDT | 30 DDT | 45 DDT | 60 DDT | 75 DDT |
|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Cepa CtpxS2-1 | 57,43 ± 1,98 A | 77,91 ± 2,31 A | 104,34 ± 1,74 A | 118,16 ± 1,09 A | 133,44 ± 1,52 A | 145,31 ± 0,69 A |
| Cepa CtpxS3-5 | 47,97 ± 1,94 B | 81,82 ± 2,88 A | 105 ± 3,43 A | 115,03 ± 1,18 A | 132,67 ± 1,22 A | 140,03 ± 0,03 B |
| TESTIGO | 44 ± 0,79 B | 77,76 ± 0,12 A | 96,03 ± 0,40 B | 116,06 ± 2,87 A | 121,86 ± 0,99 B | 126,11 ± 0,14 C |

Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$). Autoría propia.

Índice de contenido de clorofila

Se evaluó el índice de contenido de clorofila mediante una técnica no destructiva y otra destructiva. En cuanto a la técnica no destructiva (Tabla 4), se puede evidenciar diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre tratamientos a partir del día 45 al día 75 después del trasplante. El índice de contenido de clorofila al final de la fase experimental, al día 75, presentó diferencias significativas entre tratamientos ($F(2;6) = 193,00$; $p < 0,0001$), donde las plantas que recibieron *B. subtilis* Ctpx2-1 presentaron el mayor índice de contenido de clorofila con una media de 44,45 ICC (Tabla 3), en comparación con los demás tratamientos.

Tabla 4

Efecto de las aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el índice de contenido de clorofila en hojas de tomate Cherry

| TRATAMIENTO | 0 DDT | 15 DDT | 30 DDT | 45 DDT | 60 DDT | 75 DDT |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Cepa CtpxS2-1 | 17,87 ± 0,97 A | 25,96 ± 1,53 A | 31,74 ± 0,73 A | 38,24 ± 0,33 A | 38,39 ± 1,20 A | 44,45 ± 0,32 A |
| Cepa CtpxS3-5 | 18,27 ± 0,21 A | 25,95 ± 1,72 A | 27,70 ± 1,53 B | 35,51 ± 0,03 B | 35,17 ± 0,77 B | 40,76 ± 0,56 B |
| TESTIGO | 15,78 ± 0,14 B | 22,33 ± 1,29 A | 27,40 ± 0,11 B | 31,74 ± 0,13 C | 30,56 ± 0,30 C | 37,00 ± 0,48 C |

Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$). Autoría propia.

Por otro lado, utilizando la técnica destructiva (Tabla 5), se analizó el índice de contenido de clorofila (ug/ml) en hojas de tomate Cherry por espectrofotometría por efecto de inoculaciones con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 frente al testigo.

Las dos técnicas arrojaron resultados similares donde plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentaron un mayor índice de clorofila comparando con plantas que recibieron solo agua destilada.

Tabla 5

Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el índice de contenido de clorofila (ug/ml) en hojas de tomate Cherry

| | TRATAMIENTO | 30 DDT | 45 DDT | 60 DDT | 75 DDT |
|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Clorofila Total | Cepa CtpxS2-1 | 54,22 ± 1,28 A | 57,43 ± 12,02 A | 51,78 ± 1,73 A | 52,06 ± 1,03 A |
| | Cepa CtpxS3-5 | 54,40 ± 4,46 A | 54,75 ± 5,72 A | 55,60 ± 2,72 A | 48,02 ± 4,43 A |
| | TESTIGO | 54,16 ± 6,53 A | 52,48 ± 7,45 A | 38,37 ± 1,52 B | 35,30 ± 1,93 B |
| Clorofila A | Cepa CtpxS2-1 | 19,35 ± 0,74 A | 20,47 ± 4,17 A | 19,43 ± 1,72 A | 20,10 ± 0,73 A |
| | Cepa CtpxS3-5 | 19,41 ± 1,61 A | 19,48 ± 1,98 A | 20,25 ± 0,54 A | 18,29 ± 0,27 AB |
| | TESTIGO | 20,03 ± 62,99 A | 18,65 ± 2,64 A | 14,46 ± 0,95 B | 17,25 ± 1,56 B |
| Clorofila B | Cepa CtpxS2-1 | 34,86 ± 0,55 A | 36,95 ± 7,85 A | 32,36 ± 0,09 A | 31,97 ± 0,94 A |
| | Cepa CtpxS3-5 | 35,00 ± 2,85 A | 35,27 ± 3,74 A | 35,34 ± 2,21 A | 29,73 ± 4,16 A |
| | TESTIGO | 34,13 ± 4,12 A | 33,82 ± 4,81 A | 23,91 ± 1,06 B | 18,05 ± 2,98 B |

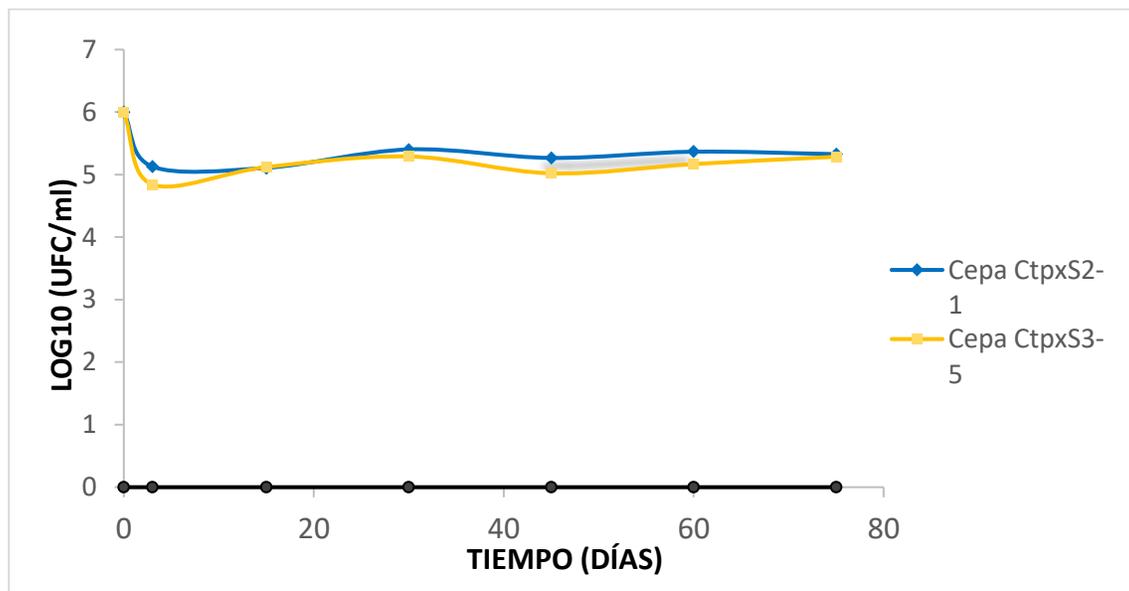
Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$).
Autoría propia.

Dinámica poblacional

En la Figura 14, se evidencia el crecimiento poblacional de las dos cepas de *B. subtilis* y el testigo en el tiempo. Tras las inoculaciones periódicas desde el inicio hasta el final de la fase experimental a los 75 días, se observó un mayor crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo (UFC/g) en los tratamientos inoculados con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 con un valor de $2,13 \times 10^5$ UFC/g y $1,95 \times 10^5$ UFC/g respectivamente, comparado con el testigo que presentó no presento crecimiento.

Figura 12

Crecimiento de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la rizosfera de plantas de tomate Cherry, por efecto de inoculaciones periódicas



Nota. Autoría propia

Porcentaje de humedad

En este estudio, se analizó el porcentaje de humedad en diferentes órganos (raíz, tallo, hojas y frutos) de la planta tomate Cherry, a los 75 días después del trasplante por efecto de inoculaciones con las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, en comparación con plantas testigo que recibieron únicamente agua. Estas cepas fueron analizadas con el fin de comprender cómo afectan en la distribución de humedad en los diferentes órganos de las

plantas. No se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos con las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5 y el testigo (Tabla 6). Sin embargo, en la Figura 13 se muestra un ligero aumento del porcentaje de humedad en raíz, tallo y hojas en la cepa CtpxS2-1, en comparación con los demás tratamientos

Tabla 6

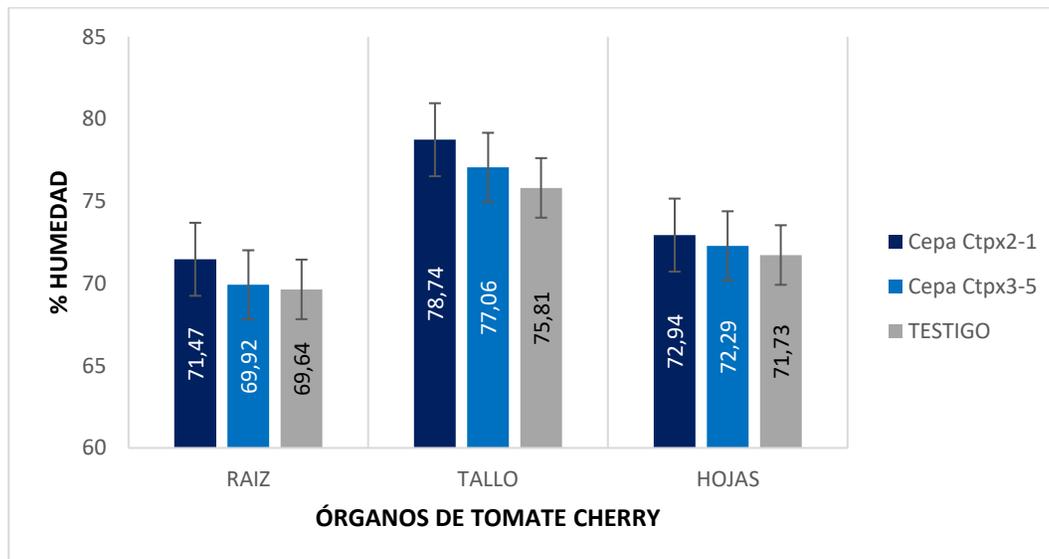
Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el porcentaje de humedad de órganos (raíz, tallo y hojas) de plantas de tomate Cherry a los 75 días después del trasplante

| TRATAMIENTO | Raíz | Tallo | Hojas |
|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Cepa CtpxS2-1 | 71,47 ± 2,57 A | 78,63 ± 1,73 A | 72,94 ± 2,52 A |
| Cepa CtpxS3-5 | 69,92 ± 3,85 A | 77,06 ± 2,20 A | 72,29 ± 1,12 A |
| TESTIGO | 69,64 ± 2,28 A | 75,81 ± 4,05 A | 71,73 ± 1,64 A |

Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$). Autoría propia.

Figura 13

Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el porcentaje de humedad de órganos (raíz, tallo y hojas) de plantas de tomate Cherry



Nota. Autoría propia

Contenido de auxinas

La cantidad de ácido indolacético obtenidas en los tres tratamientos no mostró diferencias significativas ($F(2;6) = 1,55$; $p 0,2865$) (Tabla 7), no obstante, se puede evidenciar gráficamente que las inoculaciones con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentaron un mayor contenido de auxinas en plantas de tomate Cherry, con 2,23 ug/ml y 2,62 ug/ml respectivamente luego de 75 días después del trasplante (Figura 14). Estos resultados indican que las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promueven mayores niveles de ácido indolacético en comparación con la muestra testigo en las plantas de tomate Cherry.

Tabla 7

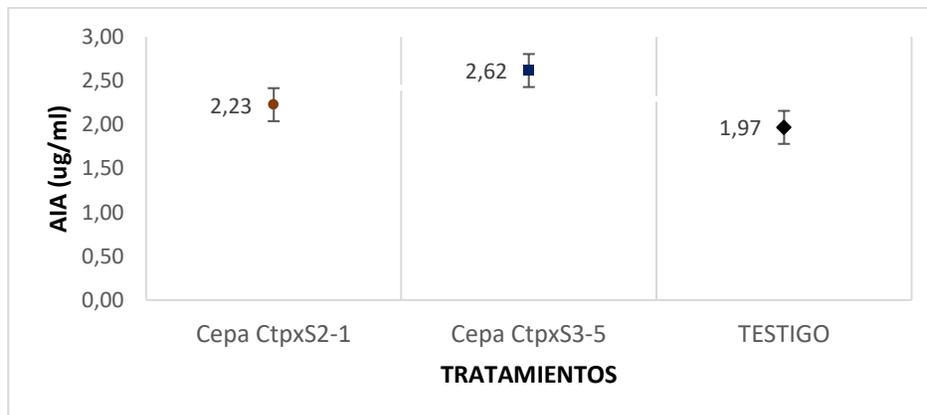
Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis en el contenido de ácido indolacético (ug/ml) en raíces de tomate Cherry

| TRATAMIENTO | AIA (ug/ml) | |
|---------------|-------------|---|
| Cepa CtpxS2-1 | 2,23 ± 0,52 | A |
| Cepa CtpxS3-5 | 2,62 ± 0,40 | A |
| TESTIGO | 1,97 ± 0,43 | A |

Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$). Autoría propia.

Figura 14

Contenido de auxinas en plantas de tomate Cherry por efecto de inoculaciones de B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5 luego de 75 días después del trasplante



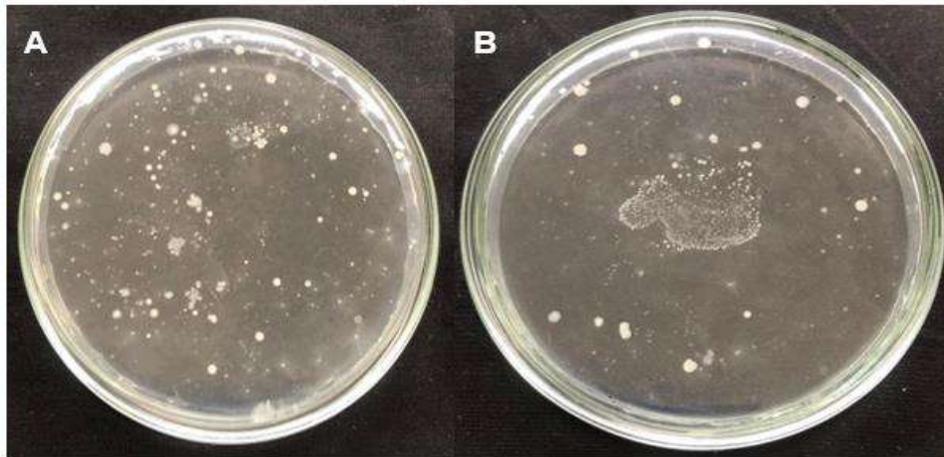
Nota. Autoría propia

Fijación de nitrógeno

Para la determinación de la capacidad de fijar de nitrógeno por parte de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en un medio libre de nitrógeno (Ashby manitol) (Sarmiento *et al.*, 2013), en la Figura 15 se evidencia el crecimiento de *B. subtilis*, los cuales fueron sembrados en una dilución 10^{-3} . Además, la cantidad de colonias que se presentó en los medios fue mayor para la cepa *B. subtilis* CtpxS2-1, demostrando una mayor capacidad de fijar este elemento. nuevamente un mayor crecimiento poblacional.

Figura 15

Crecimiento de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio libre de nitrógeno (Ashby manitol)



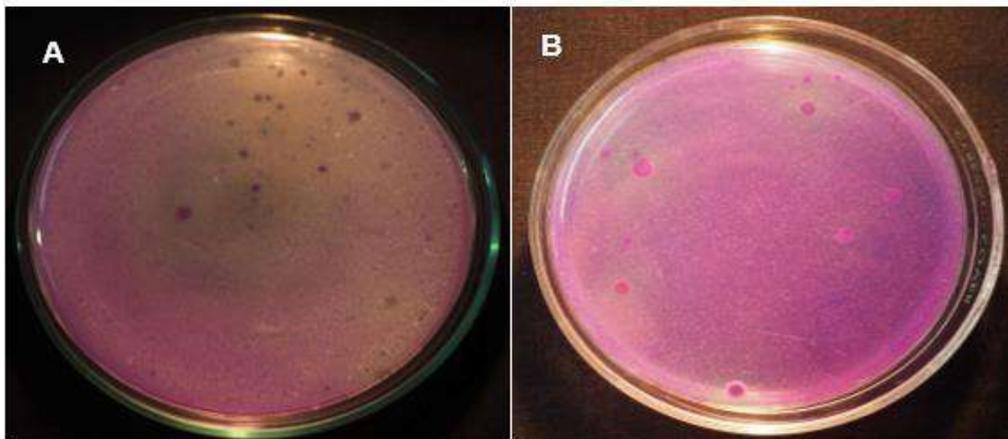
Nota. Crecimiento de bacterias (A) *B. subtilis* CtpxS2-1 (B) *B. subtilis* CtpxS3-5 en dilución 10^{-3} . Autoría propia.

Solubilización de fosfatos

En la Figura 16 se presenta los resultados obtenidos de forma cualitativa en el medio Pikovskaya (Hernández *et al.*, 2011), donde se evidencia el crecimiento poblacional de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, mediante la formación de halos amarillentos alrededor de las colonias, productos de la solubilización de fósforo de las cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5. Además, la comparación de los diferentes halos de solubilización de fosfato, en la cual la cepa *B. subtilis* CtpxS2-1 presentó halos más grandes, comparado con la cepa *B. subtilis* CtpxS3-5.

Figura 16

Solubilización de fósforo de cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5



Nota. Crecimiento de halo amarillento alrededor de las colonias (A) *B. subtilis* CtpxS2-1 (B) *B. subtilis* CtpxS3-5 en dilución 10^{-3} . Autoría propia.

Discusión

El crecimiento microbiano de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la rizosfera de plantas de tomate, mostró un efecto significativo después de la inoculación, evidenciando que *B. subtilis* contribuyen en la promoción del crecimiento vegetal y producción de fitohormonas. Según Anguiano *et al.* (2019), *B. subtilis* tiene un efecto promotor de crecimiento a partir de la tercera semana de inoculación, lo que corrobora con los resultados de esta investigación que a partir del día 30 (cuarta semana) se evidenció diferencias significativas (Tabla 2) entre los tratamientos inoculados con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en comparación con el testigo. Además, (Buensanteai y Yuen, 2008) y (Bharucha *et al.*, 2013) señalan que la promoción directa del crecimiento de las plantas depende del equilibrio entre la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético, giberelinas y citoquininas.

Asimismo, Stefan *et al.* (2013) afirman que el potencial promotor del crecimiento de dos cepas de rizobacterias *Bacillus pumilus* y *Bacillus mycoides* que en combinación o solas, fueron eficaces para aumentar las actividades fotosintéticas, la eficiencia en el uso del agua y el contenido de clorofila en plantas de fríjol en condiciones de no uso de fertilizantes químicos,

corroborar en esta investigación que en plantas de tomate Cherry bajo el efecto de *B. subtilis*, también aumento el contenido de clorofila de las hojas de los tratamientos con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5. Además, en la misma investigación Stefan *et al.* (2013) menciona que este efecto positivo es más pronunciado durante las etapas vegetativas y de floración temprana, lo que concuerda con el efecto observado en nuestro ensayo con tomate Cherry que se empezó desde la etapa vegetativa hasta la etapa de fructificación e inicio de maduración.

Por otro lado, (Martínez y Ocón, 2008) reportan la gran movilidad que posee el nitrógeno, al lograr acumular el mayor contenido de clorofila y nitrógeno en las hojas ubicadas en su tercio medio en plantas de diferentes especies, de esta forma se evidencia el aporte que ofrece *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 a la planta, por medio de ciertos mecanismos directos, entre ellos quizá el más importante como biofertilizante fijando biológicamente el nitrógeno.

En cuanto acerca de dinámica poblacional en la Figura 14, se evidencia el crecimiento poblacional de las dos cepas de *B. subtilis* en el tiempo, en la cual Corrales *et al.* (2017) mencionan que las bacterias del género *Bacillus*, son capaces de colonizar diversos hábitats, debido a su diversidad metabólica, en especial la especie *B. subtilis* que habitan la rizosfera, por ello la presencia y colonización en las cepas *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5. Según Nunes *et al.* (2023) la presencia más prolongada de la bacteria en la rizosfera daría como resultado un beneficio prolongado de promoción de crecimiento. Estos resultados coinciden con la evaluación de las variables agronómicas y fisiológicas, ya que se evidencia nuevamente que la cepa *B. subtilis* CtpxS2-1, presenta mejores resultados en la colonización de la rizosfera, promoción de crecimiento e índice de clorofila, seguida de la cepa *B. subtilis* CtpxS3-5 comparando con el tratamiento testigo.

Se ha documentado varios tipos de rizobacterias, en particular las grampositivas que son capaces de producir ácido indolacético utilizando diferentes vías metabólicas, en la cual a veces una sola cepa bacteriana abarca más de una vía (Rashid *et al.*, 2012), de tal manera que la producción de ácido indolacético puede variar entre diferentes cepas. Khan *et al.* (2016)

demuestra que la producción de ácido indolacético varía en diferentes especies y cepas de bacterias, además que las condiciones del cultivo, la etapa de crecimiento y la disponibilidad de sustrato influyen en la cantidad de producción de ácido indolacético. En nuestro ensayo la cantidad de auxinas en los tratamientos con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 fue de 2,23 µg/ml y 2,62 µg/ml respectivamente (Figura 16), mostrando que *B. subtilis*, puede producir diferentes concentraciones de metabolitos secundarios como es el caso en la producción de hormonas vegetales (Anguiano *et al.*, 2019).

En cuanto, al porcentaje de humedad en diferentes órganos (raíz, tallo y hojas) de la planta tomate Cherry, inoculadas con cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo, corroborando con la investigación de Anguiano *et al.* (2019) donde tampoco se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de humedad en tallos, hojas y raíces que evaluaron en tres cepas *B. subtilis* (BSN, BS14 y BS8) en cultivos de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente, se logró evidenciar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fosfatos de forma cualitativa, actividades que realizan por el complejo proteico mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas, con un efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal y en el aumento del potencial productivo (Corrales *et al.*, 2017). La fijación de nitrógeno mediante *B. subtilis* participan en el proceso microbiano, en el cual el nitrógeno atmosférico se reduce a amonio y se incorpora a la biomasa mediante procesos microbianos, convirtiéndose así en la fuente principal de nitrógeno para las plantas (Molina *et al.*, 2015). Además, Tejera *et al.* (2011) menciona que este proceso se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa, presente en todos los microorganismos fijadores del nitrógeno, como la especie *B. subtilis*.

Por otro lado, la capacidad de solubilización de fosfatos en el medio Pikovskaya que se evidencian mediante el crecimiento de colonias y los halos de solubilización en las cepas de estudio, en donde Ramírez *et al.* (2014) mencionan que la relación del halo en el medio y su

capacidad solubilizadora nos indican procesos de producción de enzimas como fosfatasas, fitasas y ácidos orgánicos, así como la acidificación del medio dada por la disminución del pH. Asimismo, (Fernández y Rodríguez, 2006) mencionan que las fitasas son enzimas que se encuentran distribuidas en bacterias gram positivas, como el caso de bacterias del género *Bacillus*, donde la producción de enzimas fitasas permiten la solubilización de fósforo a partir del ácido fítico, el aislamiento y caracterización de nuevos genes de fitasas, donde su manipulación constituiría una vía para incorporar a los microorganismos la capacidad de degradar el ácido fítico y así mejorar la disponibilidad de fósforo en las plantas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El efecto de la cepa de *B. subtilis* CtpxS2-1 presentó respuestas positivas en la colonización de la rizosfera en plantas de tomate Cherry, favoreciendo su crecimiento y aumento el contenido de clorofila
- El contenido de auxinas en plantas de tomate Cherry inoculada con la cepa de *B. subtilis* CtpxS3-5 tuvo un efecto mayor con 2,62 ug/ml, determinando que la concentración de ácido indolacético contribuyó con una respuesta positiva por el potencial promotor de crecimiento por acción de las fitohormonas, como ácido indol-3-acético.
- Las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 tienen la capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos, actividades que realizan mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas, funcionando como bioindicadores.
- El efecto de las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 colonizaron exitosamente la rizosfera de las plantas de tomate Cherry, lo que se evidenció con las respuestas positivas de las variables agronómica y fisiológicas del cultivo.

Recomendaciones

- Continuar con el seguimiento de las plantas de tomate Cherry en un periodo más largo para obtener un crecimiento bacteriano de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC/g) mayor y su efecto en la producción y calidad.
- Realizar otras investigaciones similares en diferentes especies de solanáceas para determinar si el efecto de *B. subtilis* es igual o mayor que en tomate Cherry.
- Analizar el crecimiento bacteriano de *B. subtilis* por medio de la densidad óptica en espectrofotómetro, para evidenciar la concentración real de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC/g).
- Determinar en futuras investigaciones el incremento de las cantidades de nitrógeno y fósforo en las plantas bajo el efecto de *B. subtilis* mediante mecanismos como fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato.

Bibliografía

- Adriano, M. de L., Jarquín, R., Hernández, C., Figueroa, M., y Monreal, C. (2011). Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(3), 417–431.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263119714009>
- Álvarez, C. L., Osorio Vega, W., Díez Gómez, M. C., y Marín Montoya, M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 225–241.
<https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15426>
- Anguiano, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., y Laredo Alcalá, E. (2019). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6(418), 1–13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., y Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338–347.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Bharucha, U., Patel, K., y Trivedi, U. B. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, 2(3), 215–221.
<https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>
- Buensanteai, N., y Yuen, G. (2008). The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Produces Auxin, Surfactin and Extracellular Proteins for Enhanced Growth of Soybean Plant Lysobacter Enzymogenes Induced Host Resistance View project. *Thai Journal of Agricultural Science*, 41((3-4)), 101–116.
<https://www.researchgate.net/publication/268337617>

- Celis, L., y Gallardo, I. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos* [Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Javeriana]. <http://hdl.handle.net/10554/8948>
- Chailleux, A., Mohl, E. K., Teixeira Alves, M., Messelink, G. J., y Desneux, N. (2014). Natural enemy-mediated indirect interactions among prey species: Potential for enhancing biocontrol services in agroecosystems. *Pest Management Science*, 70(12), 1769–1779. <https://doi.org/10.1002/ps.3916>
- Chandrasekaran, M., y Chun, S. C. (2016). Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(11), 2277–2283. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1206811>
- Corrales, L. C. R., Caycedo-Lozano, L., Gómez-Méndez, M. A., Ramos-Rojas, S. J., y Rodríguez-Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: An alternative for plant promotion by two enzymatic pathways. *Nueva*, 17(27), 46–65. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000100046&lng=en&tlng=
- Falconí, C. E., y Yáñez, V. (2022). Available Strategies for the Management of Andean Lupin Anthracnose. *Plants*, 11(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/plants11050654>
- Falconí, C. E., Yáñez Mendizábal, V., y 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 Technology*, 12(6), 2519–2526. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.12.6.17169>
- Fernández, C., y Rodríguez, H. (2006). Aplicaciones biológicas de las fitasas: papel en los fertilizantes microbianos. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 40(2), 27–34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664004>

- Fornaris, G. (2007). Variedades y su selección. In *Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate de Ensalada* (pp. 2–6). Universidad de Puerto Rico. <https://www.uprm.edu/wp-content/uploads/sites/382/2016/04/TOMATE-Variedades-y-su-Seleccion-v2007.pdf>
- Glickmann, E., y Dessaux, Y. (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- González, D. (2007). *Efectividad biológica de un fulvato de fierro en la calidad y producción de tomate Cherry (Lycopersicon esculentum Mill.) Var. Red Cherry* [Tesis de Pregrado, Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”].
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6365>
- González, D. A., Álvarez Hernández, U., y Lima Orozco, R. (2018). Acumulación de biomasa fresca y materia seca por planta en el cultivo intercalado caupí - sorgo. *Centro Agrícola*, 45(2), 77–82. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000200011&lng=es&tying=es.
- González, Y., Ortega Bernal, J., Anducho Reyes, M. A., y Mercado Flores, Y. (2022). Bacillus subtilis y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25(1), 1–14.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Gordon, S. A., y Weber, R. P. (1950). Colorimetric Estimation of indoleacetic Acid. *Journal of Plant Physiology*, 26(1), 192–195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Gutiérrez, J., y Probanza, A. (2000). *Bacterias productoras de giberelinas y estimulantes del crecimiento vegetal*.
<https://patentimages.storage.googleapis.com/03/70/fd/7940295a8ff605/WO2000043497A1.pdf>

- Guzmán, A., Corradini, F., Martínez, J. P., Torres, A., Allende, M., Torres, A., Abarca, P., Felmer, S., Antúnez, A., Riquelme, J., Salinas, L., Olivares, N., y Sepúlveda, P. (2017). *Manual de cultivo del tomate al aire libre*. INIA.
https://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/20.500.13082/29488/INIA_Libro_0049.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hashem, A., Tabassum, B., y Fathi Abd_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 26, Issue 6, pp. 1291–1297). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hernández, T. I., Carrión, G., y Heredia, G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45(8), 881–892.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ho, S. H., Chen, C. Y., y Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244–252.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>
- Infoagro. (2023). *El cultivo del tomate (Parte I)*. Recuperado el 4 de febrero de 2023 de https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate__parte_i_.asp
- Jaramillo, J., Rodríguez, V., Guzmán, M., Zapata, M., y Rengifo, T. (2007). *Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas*. FAO. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13469>
- Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., y Lee, I. J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 58–64.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.001>

- López, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo de tomate (Solanum Lycopersicum)*. INTA.
<https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- López, L. M., Sarmiento, A. P., Fajardo, J. I., Valarezo, L. E., y Zuluaga Gallego, R. (2013). Determinación del porcentaje de humedad, solubles e insolubles en agua de la fibra de *Carludovica Palmata* (paja toquilla). *Ingenio. Revista de Ciencia y Tecnología*, 9, 23–27.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=505554814004>
- Mahmood, A., Turgay, O. C., Farooq, M., y Hayat, R. (2016). Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: A review. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), 1–14.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>
- Martínez, L., y Ocón, P. (2008). *Utilización del clorofilometro SPAD-502 para diagnosticar la deficiencia del Nitrógeno en sorgo (sorghum bicolor L Moench) bajo distintas dosis de Nitrógeno San Ramón Matagalpa*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Agraria].
<https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2062>
- Medina, C., y Lobo, M. (2001). Variabilidad morfológica en el tomate paiarito (*Lycopersicon esculentum* var. *cerosiforme*), precursor del tomate cultivado. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 3(2), 39–50.
https://doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol3_num2_art:186
- Meza, J., Pantoja, A., Roman, P., Godoy, N., Gattini, J., Villasanti, C., Chávez, R., y Díaz, J. (2013). *El Cultivo de Tomate con Buenas Prácticas Agrícolas en la Agricultura Urbana y Periurbana* (FAO). <https://www.fao.org/3/i3359s/i3359s.pdf>
- Molina, D. R., Bustillos, M., Rodríguez-Andrade, O., y Morales-García, Y. E. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de La Dependencia de Educación Superior Ciencias Biológico Agropecuarias*, 17(2), 24–34. <https://www.researchgate.net/publication/293086504>
- Moreno, A. R., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., y Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de

- biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., y Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 15(2), 327–337. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=7578>.
- Nunes, P., Medeiros, F., y Oliveira, T. (2023). *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* promueven el crecimiento del tomate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54, 397–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s42770-022-00874-3>
- Pereira, da C., Cambiaso, V., Picardi, L. A., Pratta, G. R., y Rodríguez, G. R. (2021). Mejoramiento de la calidad del fruto por la incorporación de genes de especies silvestres en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Basic and Applied Genetics*, 32(Issue 2), 40–47. <https://doi.org/10.35407/bag.2021.32.02.05>
- Pinho, L., Almeida, A. C., Costa, C. A., Paes, M. C. D., Glória, M. B. A., y Souza, R. M. (2011). Nutritional properties of cherry tomatoes harvested at different times and grown in an organic cropping. *Horticultura Brasileira*, 29(2), 205–211. <https://doi.org/http://doi.org/10.1590/S0102-05362011000200012>
- Plantas y Flores. (2023). *Tomate Pera Amarilla. Origen, Descripción, Cultivo, Cuidados, Propiedades*. Recuperado el 23 de enero de 2023 de <https://plantasyflores.pro/tomate-pera-amarilla/>
- Quirós, S. C. (2016). *Guía para la producción de tomate en agricultura familiar*. INTA. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/14147>
- Ramírez, L., Ligía, S., Galvez, Z., y Burbano, V. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *NOVA*, 12(21), 165–178. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702014000200006&lng=en&lng=es.

- Rashid, S., Charles, T. C., y Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217–224.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2011.09.011>
- Saavedra, G. (2020). *Tomate (Solanum lycopersicum L.)*. INIA .
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6818/Capitulo%201.%20Tomate.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Sánchez, F. E. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Bionatura*, 1(3), 135–138.
<https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.03.7>
- Sarmiento, Y., Hazel, A., y Cárdenas, M. D. (2013). Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos Evaluation of the stability of *Trichoderma* sp. and *Azotobacter* sp. preserved by different methods. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 150–158.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752013000100016&lng=en&lng=es.
- Sinde, I., Falconí Saá, C. E., Luna-Granizo, P., Godoy-Guanín, L., Gil-Docampo, M. de la L., Manguashca, J., y Nato, R. (2022). Spectral analysis of the phenological stages of *Lupinus mutabilis* through spectroradiometry and unmanned aerial vehicle imaging with different physical disinfection pretreatments of seeds. *Geocarto International*, 37(24), 7143–7160. <https://doi.org/10.1080/10106049.2021.1960431>
- Singh, B., y Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review Sustainable development using PGPR View project Vibha Nehra Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011, 1–30. <https://www.researchgate.net/publication/284340739>
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M., y Hritcu, L. (2013). Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean

(*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae*, 151, 22–29.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.006>

Swarnalakshmi, K., Yadav, V., Tyagi, D., Dhar, D. W., Kannepalli, A., y Kumar, S. (2020).

Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: Growth promotion and crop production. *Plants*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/plants9111596>

Tejera, B., Rojas-Badía, M. M., y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género

Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131–138.

<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>

Vásconez, R. D. A., Moya, E. M. T., Jara, K. A. M., y Chiluisa-Utreras, V. P. (2020). Molecular identification of strains of *Bacillus* spp. And its use as growth-promoting rhizobacteria in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 575–581.

<https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2020.04.13>

Velasco, M. de J., Castro-Brindis, R., Castillo-González, A. M., Avitia-García, E., Sahagún-

Castellanos, J., y Lobato-Ortiz, R. (2016). Composición mineral, biomasa y rendimiento en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) injertado. *Revista Interciencia*, 41(10), 703–708.

<https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/10/703-LOBATO-41-10.pdf>

Warnock, S. J. (1988). A Review of Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Lycopersicon*.

Horticultural Science, 23(4), 669–673.

<https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.23.4.669>

Yáñez, V., y Falconí, C. E. (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://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.004>

Yáñez, V., y Falconí, C. E. (2021). *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance

against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters*, 43(3), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03066-x>

- Yáñez, V., Falconí, C. E., y Kanaley, K. (2023). Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium. *Biological Control*, 185, 105306. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2023.105306>
- Yáñez, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., y 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://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Zanfini, A., Franchi, G. G., Massarelli, P., Corbini, G., y Dreassi, E. (2017). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in five tomato (*lycopersicon esculentum* mill.) cultivars. *Italian Journal of Food Science*, 29(1), 90–99. <https://www.itjfs.com/index.php/ijfs/article/view/316>
- Zhang, X., Dippold, M. A., Kuzyakov, Y., y Razavi, B. S. (2019). Spatial pattern of enzyme activities depends on root exudate composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 133, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.010>