



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

Calapaqui Calle, Karina Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

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

Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph. D

15 de agosto del 2022



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) bajo condiciones de invernadero**, fue realizado por la señorita **Calapaquí Calle, Karina Alexandra**; la misma que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente

Sangolquí, 15 de agosto del 2022



CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

Ing. Falconi Saá César Eduardo Ph. D

C.C. 0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo **Calapaqui Calle, Karina Alexandra**, con cédula de ciudadanía No 1724397318, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) bajo condiciones de invernadero**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 15 de agosto del 2022

Calapaqui Calle, Karina Alexandra

C.C: 1724397318



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, **Calapaqui Calle, Karina Alexandra**, con cédula de ciudadanía No. **172439731-8** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación del efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) bajo condiciones de invernadero**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 15 de agosto 2022

Calapaqui Calle, Karina Alexandra

C.C: 1724397318

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

Calapaqui Calle, Karina Alexandra_CFS.docx

Scanned on: 15:31 August 15, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	343
Words with Minor Changes	9
Paraphrased Words	127
Omitted Words	2114



Firmado electrónicamente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

.....
Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph. D.
0601556459

Dedicatoria

A Dios, por darme salud, fuerza y voluntad para cumplir cada una de mis metas.

Dedico este trabajo a mis padres, por su cariño, sacrificio, comprensión y apoyo incondicional en todo mi proceso de formación académica y personal, gracias por ser mi ejemplo de vida, paciencia y amor.

A mis hermanos Melissa, Silvana y Darío, por estar siempre presentes en los momentos más difíciles de mi vida, por su amor, apoyo y buenos consejos.

A mi sobrina Ághata, por el cariño y felicidad brindada día a día.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a todos los docentes y autoridades que conforman la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, por brindarme su apoyo y conocimiento a lo largo de los años.

A mi tutor de tesis Ing. César Falconí Ph. D, por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a él, por los conocimientos brindados y por haberme guiado con paciencia y dedicación a lo largo del proceso de mi trabajo de titulación.

A Darío Heredia, por haber sido uno de los pilares fundamentales durante muchos años de mi formación académica, gracias por tu paciencia, apoyo y amistad incondicional.

Al Ing. Darwin Claudio por su guía, paciencia y consideración durante el desarrollo de mi trabajo de titulación.

A mis amigos Kevin, Alexander y Esteban, por su sinceridad, cariño y amistad brindada durante los años de mi formación académica.

A Anthony Ruiz, por todas las experiencias compartidas, apoyo y lealtad.

A Marvin Gómez por sus consejos y apoyo en momentos difíciles durante mi vida universitaria.

A mis amigos y compañeros en mi proceso de titulación: Brayhant y Diego, gracias por su colaboración, solidaridad y amistad.

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación	2
Responsabilidad Autoría.....	3
Autorización de Publicación.....	4
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I.....	16
Introducción.....	16
Antecedentes.....	16
Justificación	17
Objetivos	18
<i>Objetivo General</i>	18
<i>Objetivos específicos</i>	18
Hipótesis.....	18
Capítulo II.....	19
Marco Referencial	19
Cáñamo (<i>C. sativa</i>).....	19
Situación legal del Cáñamo en el Ecuador.	19
Etapas fenológicas de Cáñamo (<i>C. sativa</i>).....	20

<i>Etapa principal de crecimiento 0: Germinación y brotación</i>	20
<i>Etapa principal de crecimiento 1: Desarrollo de la hoja</i>	20
<i>Etapa principal de crecimiento 2: Formación de brotes laterales</i>	20
<i>Etapa principal de crecimiento 3: Alargamiento del tallo</i>	21
<i>Etapa principal de crecimiento 5: Aparición de la inflorescencia</i>	21
<i>Etapa principal de crecimiento 6: Floración</i>	21
<i>Etapa principal de crecimiento 7: Desarrollo del fruto</i>	21
<i>Etapa principal de crecimiento 8: Maduración del fruto</i>	21
<i>Etapa principal de crecimiento 9: Senescencia</i>	21
Cannabinoides	22
Flavonoides.....	22
Plagas y enfermedades de <i>C. sativa</i>	22
Plagas	22
<i>Áfidos</i>	22
<i>Mosca blanca</i>	23
<i>Barrenador del cáñamo (Grapholita delineana)</i>	24
Enfermedades.....	24
<i>Moho gris (Botrytis cinerea)</i>	24
<i>Marchitamiento fúngico (Damping off)</i>	24
<i>Marchitamiento (Fusarium oxysporum)</i>	25
Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR).....	25
<i>Bacillus subtilis</i>	26
Promotor de crecimiento	26
Inducción a la resistencia sistémica	26

Actividad antifúngica y antibacteriana.....	27
Capítulo III.....	29
Materiales y Métodos.....	29
Ubicación geográfica del lugar de investigación	29
Preparación de medios cultivo	30
Preparación del inóculo de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5.....	30
Preparación de sobrenadante de <i>B. subtilis</i>	30
Control de calidad de <i>B. subtilis</i> crecido en medio de bajo coste	31
Inoculación de <i>B. subtilis</i> en semilla de <i>C. sativa</i>	32
Establecimiento de plantas de <i>C. sativa</i> en invernadero.....	33
Inoculación de <i>B. subtilis</i> en plantas de <i>Cannabis sativa</i> :.....	33
Dinámica poblacional.....	34
Cuantificación de índice de contenido de clorofila y altura de planta	35
Porcentaje de Humedad	35
Colonización de raíz.....	36
Diseño experimental.....	36
Análisis estadístico.....	39
Capítulo IV.....	40
Resultados.....	40
Porcentaje de germinación	40
Altura de plantas de <i>C. sativa</i>	41
Cuantificación de Clorofila	44
Porcentaje de Humedad	48
Longitud de raíz	49

Dinámica poblacional y colonización de raíz.....	50
Capítulo V.....	51
Discusión.....	51
Capítulo VI.....	54
Conclusiones y Recomendaciones	54
Conclusiones.....	54
Recomendaciones.....	54
Bibliografía	56

Índice de tablas

Tabla 1 Factores a evaluar.....	37
Tabla 2 Tratamientos para la inoculación de <i>B. subtilis</i> en <i>C. sativa</i>	38
Tabla 3 Media \pm desviación estándar de la variable altura en plantas de <i>C. sativa</i>	42
Tabla 4 Análisis de varianza para la altura de plantas de cáñamo.....	43
Tabla 5 Media \pm desviación estándar de la variable clorofila en plantas de <i>C. sativa</i>	44
Tabla 6 Análisis de varianza para el contenido de clorofila de las plantas de cáñamo.....	45
Tabla 7 Media \pm desviación estándar de la variable peso fresco y peso seco en plantas de <i>C. sativa</i>	47

Índice de figuras

Figura 1 Visión satelital del lugar de estudio	29
Figura 2 Filtrado de sobrenadante.....	31
Figura 3 Disposición de las semillas en cámaras húmedas.....	32
Figura 4 Establecimiento del ensayo.....	33
Figura 5 Conteo de colonias	34
Figura 6 Recolección de datos de clorofila	35
Figura 7 Croquis del diseño experimental	38
Figura 8 Porcentaje de germinación de semillas de <i>C. sativa</i>	40
Figura 9 Porcentaje de humedad en tallos, hojas y raíces de <i>C. sativa</i>	48
Figura 10 Longitud de raíz de las plantas de <i>C. sativa</i>	49
Figura 11 Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> Ctpx S-1 y S3-5.....	50

Resumen

En esta investigación se evaluó el efecto de dos cepas de la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 y Ctpx S3-5, desarrollado en un medio de bajo coste, donde se extrajeron células y sobrenadantes para promover el crecimiento de *Cannabis sativa* L. Estos inóculos fueron aplicados en treinta plantas de cáñamo distribuidas en cinco tratamientos (T1: Células de *B. subtilis* Ctpx S2-1; T2: Sobrenadante *B. subtilis* Ctpx S2-1; T3: Células de *B. subtilis* Ctpx S3-5; T4: Sobrenadante *B. subtilis* Ctpx S3-5), incluyendo al control (T0: agua destilada), este estudio se realizó bajo condiciones de invernadero desde la etapa de germinación hasta los 90 dds. Los mejores resultados se obtuvieron de las inoculaciones correspondientes a las células de *B. subtilis* de ambas cepas, sin embargo, las plantas inoculadas con la suspensión celular de *B. subtilis* Ctpx S2-1 proporcionaron valores más altos que la cepa Ctpx S3-5 sin llegar a marcar una diferencia significativa en las variables evaluadas.

Respecto al crecimiento de la planta el valor más alto reportado a los 90 días fue el correspondiente a T1 con 86.7 cm de altura, de la misma manera, las medias más altas para peso fresco y seco fueron de 45.62 y 12.38 respectivamente, el valor más alto en la longitud de las raíces de *C. sativa* fue de 44.42 cm en las plantas del T1. Los tratamientos inoculados con los sobrenadantes de las células no presentaron resultados favorables incluso a comparación con el tratamiento control. El inóculo inicial de ambas cepas al suelo fue de 2×10^6 ufc/ml, sin embargo, al finalizar la investigación a los 90 días se reportaron valores de 4.6×10^{15} UFC/g suelo (S2-1) y 3.7×10^{14} (S3-5) UFC/g suelo.

Palabras clave: Cáñamo, *Bacillus subtilis*, promotor de crecimiento, sobrenadante, células.

Abstract

In this research was evaluated the effect of two strains of the plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 and Ctpx S3-5, developed in a low cost medium. Where cells and supernatants were extracted to promote the growth of *Cannabis sativa* L. These inoculums were applied on thirty hemp plants distributed in five treatments (T1: Cells of *B. subtilis* Ctpx S2-1; T2: *B. subtilis* Ctpx S2-1 supernatant; T3: *B. subtilis* Ctpx S3-5 cells; T4: *B. subtilis* Ctpx S3-5 supernatant), including the control (T0: distilled water). This study was carried out under greenhouse conditions from the germination stage until 90 days after seeding. The best results were obtained from the inoculations corresponding to the *B. subtilis* cells of both strains, however, the plants inoculated with the cell suspension of *B. subtilis* Ctpx S2-1 provided higher values than the Ctpx S3-5 strain without marking a significant difference in the variables evaluated. Regarding plant growth, the highest value reported at 90 days was that corresponding to T1 with 86.7 cm in height, likewise, the highest means for fresh and dry weight were 45.62 and 12.38 respectively, the highest value in the length of the roots of *C. sativa* was 44.42 cm in the plants of T1. The treatments inoculated with cell supernatants did not show favorable results even compared to the control treatment. The initial inoculum of both strains to the soil was 2×10^6 cfu/ml, however, at the end of the research after 90 days, values of 4.6×10^{15} CFU /g soil (S2-1) and 3.7×10^{14} (S3-5) CFU/g soil were reported.

Keywords: Hemp, *Bacillus subtilis*, growth promoter, supernatant, cells

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

Cannabis sativa L. es una planta herbácea anual de entre 1 y 6 m de altura a la que se le atribuye múltiples usos de acuerdo a su contenido de tetrahidrocannabinol (THC), sustancia que diferencia a esta planta en cannabis medicinal que tiene efecto analgésico, antiespasmódico, cannabis lúdico que permite una relajación de los sentidos y el cannabis de fibra o cáñamo con contenidos de THC inferiores a 0.3%, usado industrialmente con fines textiles.

El cáñamo, llega a producir hasta 25 t de materia seca por hectárea de los cuales 20 t provienen de su tallo, biomasa susceptible a ser transformada, por su alto contenido de celulosa y en menor grado hemicelulosa y lignina, en contraste con otros cultivos de uso industrial (Struik et al., 2000).

La raíz pivotante del cáñamo puede medir de 1.30 m hasta más de 2 m. La mayor cantidad de biomasa se encuentra en los primeros 0.50 m de profundidad, lo que representa un aspecto beneficioso para el suelo cultivado ya que estas raíces proporcionan una gran fuente de materia orgánica que con el tiempo aportará nutrientes al suelo además de mejorar sus características estructurales necesarias para mantener un cultivo (Amaducci et al., 2008)

Bacillus subtilis es una rizobacteria promotora del crecimiento (PGPR por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) de las plantas a través de métodos directos e indirectos a través de metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos (Cabello et al., 2019).

Los compuestos orgánicos volátiles que producen las bacterias regulan el metabolismo de fitohormonas en las plantas, promoviendo el crecimiento y la actividad fotosintética, esto se traduce en el aumento de biomasa y la actividad fotosintética (Tahir, Gu, Wu, Raza, Hanif, et al., 2017).

(Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018), aislaron dos cepas de *Bacillus* (*B. subtilis* Ctpx 2-1 y *B. subtilis* Ctpx 3-5) a partir de las vainas de *L. mutabilis* y demostraron su eficiencia en el control de la

antracnosis causada por *C. acutatum*, además de otras cepas de *Bacillus* han evidenciado ser un agente de biocontrol incluso en la pos-cosecha de los frutos (Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

Justificación

La asociación PGPR en la rizósfera tienen la capacidad de producir sustancias volátiles, que además de regular el crecimiento, inducen a la resistencia sistémica en plantas, sin causar efectos negativos en el medio ambiente (Tahir, Gu, Wu, Raza, Safdar, et al., 2017).

Se ha determinado que entre las diferentes especies de PGPR existentes, el género de *Bacillus* se considera la especie más eficaz por su capacidad de producir esporas resistentes a condiciones ambientales adversas (Tahir, Gu, Wu, Raza, Safdar, et al., 2017).

(Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018) evaluaron la eficacia de cuatro cepas de *Bacillus subtilis* con habilidades demostradas para controlar antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) en semillas de lupino y comprobaron que las cepas *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 de 72 h de edad tuvieron alta actividad anti fúngica inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *C. acutatum* reduciendo la infección de semillas hasta niveles indetectables y aumentando el porcentaje de germinación del lupino. Adicional a ello, (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021) mencionan que *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induce el crecimiento radical y promueve la resistencia inducida en la planta.

(Yáñez-Mendizábal et al., 2012) desarrolló un medio de bajo coste para *B. subtilis* con diversas fuentes de nitrógeno y adicionando sales MOLP (Medio Optimizado para Producción de Lipopéptidos), de tal forma que se puedan reaislar y almacenar a largo plazo en criobolas (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018).

En consecuencia, considerando la versatilidad de la bacteria y la necesidad de aumentar la biomasa en el cultivo de cáñamo, se propone el uso de *B. subtilis* como una alternativa válida para inducir el crecimiento de las plantas, mejorar la producción y la productividad del cultivo, sin hacer uso de métodos químicos, poco amigables con el medioambiente.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento del cáñamo (*C. sativa*) bajo condiciones de invernadero.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las células y el sobrenadante de *B. subtilis* en la promoción del crecimiento del cáñamo (*C. sativa*) en su fase vegetativa.
- Determinar la población viable de *B. subtilis* crecido en un medio de bajo coste durante la etapa vegetativa del cáñamo (*C. sativa*).
- Monitorear la dinámica poblacional de *B. subtilis* presente en la rizósfera del cultivo cada 15 días durante 3 meses.

Hipótesis

- H0: Células o sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecidos en medio de bajo costo no promueven el crecimiento de plantas de cáñamo.
- H1: Células o sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecidos en medio de bajo costo promueven el crecimiento de plantas de cáñamo.

Capítulo II

Marco Referencial

Cáñamo (*C. sativa*)

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

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

Situación legal del Cáñamo en el Ecuador.

El 17 de septiembre del 2019 la Asamblea Nacional del Ecuador aprobó la reforma del Código Orgánico Integral Penal (COIP) para el uso del cannabis con fines medicinales o terapéuticos permitiendo únicamente el cultivo y procesamiento del cáñamo industrial. Posteriormente, el 19 de octubre de 2020 el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador expide el Acuerdo Ministerial No.109, donde se especifica los procesos de siembra, cosecha, procesamiento, comercialización y

exportación de cannabis no psicoactivo o cáñamo para uso industrial, cuya concentración de THC (delta-9-Tetrahidrocannabinol) sea menor al 1 % en peso seco. Adicionalmente en el Acuerdo Ministerial No. 141 se detallan las tarifas a pagar por cada licencia que sea solicitada por el interesado de acuerdo a su necesidad como la importación, siembra, producción, procesamiento, comercialización, adquisición, exportación de cannabis no psicoactivo o cáñamo para uso industrial (LASA, 2021).

Etapas fenológicas de Cáñamo (*C. sativa*)

Según la escala BBCH, el cáñamo tiene nueve estadios principales que deben ser bien identificados para una adecuada planificación de aplicaciones fertilizantes y control de plagas además de las labores culturales del cultivo.

Etapas principales de crecimiento 0: Germinación y brotación

Esta etapa se describe desde el estadio 0 cuando la semilla del cáñamo se encuentra en estado seco hasta el estadio 9 donde se ha presenciado la imbibición completa de las semillas y la presencia de la radícula, hasta su estado de emergencia en el que los cotiledones han surgido del sustrato en el que han sido sembradas (Mishchenko et al., 2017).

Etapas principales de crecimiento 1: Desarrollo de la hoja

En esta fase se presencia el despliegue completo de los cotiledones y la aparición de las primeras hojas, esta etapa va desde el estadio 10 hasta el 19. En el estadio 11 se puede encontrar un par de hojas verdaderas simples y a partir del 12 hasta el 19 se podrá observar hojas compuestas, al final de esta etapa se va a encontrar más de 9 pares de hojas verdaderas en la planta (Mishchenko et al., 2017)..

Etapas principales de crecimiento 2: Formación de brotes laterales

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

Etapa principal de crecimiento 3: Alargamiento del tallo

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

Etapa principal de crecimiento 5: Aparición de la inflorescencia

Para el estadio 51 se hacen visibles los primeros botones florales individuales de las flores masculinas y en 4 días más su presencia será masiva. Al estadio 59 serán evidentes las 5 partes principales de las flores masculinas, aunque sus capullos todavía estarán cerrados (Mishchenko et al., 2017)..

Etapa principal de crecimiento 6: Floración

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

Etapa principal de crecimiento 7: Desarrollo del fruto

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

Etapa principal de crecimiento 8: Maduración del fruto

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

Etapa principal de crecimiento 9: Senescencia

En este estadio se aprecia la caída de las hojas superiores ya que el 50% de ellas estarán muertas y para el estadio 99 se podrá cosechar el producto (Mishchenko et al., 2017)..

Cannabinoides

Cannabis spp. presenta en su estructura más de cien tipos de cannabinoides, en diferentes concentraciones de acuerdo al tipo de cepa de la cual sean extraídos (Sordo & Gual, 2022). Los más estudiados son el Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN).

Se ha demostrado que el THC tiene efectos psicotogénicos, lo que deriva en el aumento de la activación cerebral y el flujo sanguíneo, por otro lado, el cannabinoide CBD, extraído con fines medicinales, tiene efectos opuestos a los mencionados anteriormente (Gunasekera et al., 2021). Adicionalmente, el CBD presenta efectos antioxidantes, relajantes y antiinflamatorios.

Flavonoides

Estos compuestos, son alcaloides responsables del mecanismo de defensa de las plantas de *C. sativa*, se conoce que existen alrededor de diecinueve flavonoides presentes a manera de compuestos fenólicos que cumplen una variedad de funciones en la planta (Ángeles et al., 2015).

Plagas y enfermedades de *C. sativa*

Plagas

Gracias a los flavonoides presentes en los tricomas de *C. sativa*; dos de tipo no glandular y tres de tipo glandular. Estas sustancias son muy representativas en el control biológico de plagas en su movilidad y en la de los enemigos naturales, además en su interacción con las presas (López et al., 2022). Pese a esto es importante conocer a fondo los principales patógenos que afectan a esta planta para poder realizar un manejo preventivo adecuado que garantice la salud y el rendimiento del cultivo,

Áfidos

También llamados pulgones, los áfidos son insectos diminutos alados y no alados que se alimentan de la savia de las plantas perforándola por lo que usualmente son considerados vectores de

virus, bacterias y hongos. El ambiente óptimo para el desarrollo de este tipo de plaga son los lugares con humedad relativa alta, poca precipitación y viento suave (Fassio et al., 2013).

Esta plaga se ubica generalmente en la zona abaxial de las hojas, sobretodo cerca de las nervaduras y los pecíolos y también en el tallo. El *cannabis Phorodon* es una plaga específica de *C. sativa*, el cual se distribuye por toda la planta, además de ser de rápida reproducción (López et al., 2022).

El control que se realiza comúnmente contra esta plaga se basa la aplicación de productos químicos preventivos y en el control biológico con base a la liberación de enemigos naturales del insecto, específicamente el mosquito de las agallas *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani) y la crisopa verde (*Chrysoperla carnea*) (López et al., 2022).

Mosca blanca

Este insecto chupador, se caracteriza por presentar una cera blanca y harinosa en sus cuatro alas. La mosca blanca se alimenta de savia, la que después es excretada a manera de mielecilla que es un indicador de la presencia de fumagina que causa el amarillamiento de las hojas y su posterior senescencia. Esta hemíptera se desarrolla favorablemente en ambientes cálidos como los de invernadero (Flint, 2015).

Trialeurodes vaporariorum, *Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii* son las tres especies de mosca blanca que atacan al cultivo de *C. sativa* (Fassio et al., 2013). El manejo contra mosca blanca usualmente es preventivo, se hace uso de trampas monocromáticas y en el caso de presentar infestación por mosca blanca, se requiere encontrar la planta que presenta la mayor incidencia de la plaga y separarla del resto del cultivo. También se pueden realizar aplicaciones de insecticidas sistémicos, aunque esto puede resultar contraproducente en los enemigos naturales de la plaga y polinizadores benéficos (Flint, 2015).

Barrenador del cáñamo (Grapholita delineana)

Originario de EE. UU. Es una plaga de alto impacto en las plantaciones de cáñamo, las larvas del barrenador atacan a los tallos de las plantas destruyendo la fibra, lo que afecta gravemente al rendimiento de la plantación, además atacan la inflorescencia y consumen la semilla (Taylor et al., 2002).

Los daños ocasionados por este insecto se pueden apreciar principalmente en tallos, inflorescencias y semillas, se sabe que cada larva puede consumir hasta dieciséis semillas (Fassio et al., 2013).

Enfermedades

Moho gris (Botrytis cinerea)

Es un hongo parásito que tiene una amplia gama de hospederos desde malezas hasta plantas hortícolas y ornamentales, esta enfermedad se desarrolla en climas con temperaturas bajas, humedad relativa alta y cuando existen residuos agua sobre los tejidos de la planta (Quinatoa, 2015). Bajo estas condiciones se ha demostrado que *B. cinerea* puede destruir un cultivo de cáñamo en una semana (Fassio et al., 2013).

Para prevenir esta enfermedad se debe evitar mantener frutos maduros o material vegetal en el suelo o cerca del cultivo, es importante mantener monitoreado el cultivo en épocas donde la humedad relativa es alta. Su tratamiento químico es realizado con productos como Mancozeb u otros productos a base de metal axil (Quinatoa, 2015).

Marchitamiento fúngico (Damping off)

También conocida como el mal del semillero, es una enfermedad ocasionada principalmente en plantas jóvenes de una a dos semanas de edad y es ocasionada por una variedad de patógenos entre los principales: *Pythium sp*, *Phytophthora sp*. y *Fusarium sp*. Esta enfermedad provoca la pudrición de la raíz

generalmente desde la punta hasta el tallo de la planta (Sarmiento & Maldonado, 2013). Existen dos especies de *Pythium* que atacan específicamente a *C. sativa*, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium ultimum* (Fassio et al., 2013).

Para evitar el ataque de esta enfermedad se requiere una previa desinfección del sustrato antes de la siembra de semillas y hacer uso de un control biológico basado en *Trichoderma spp.*

Marchitamiento (*Fusarium oxysporum*)

Es una enfermedad de origen vascular de gran importancia a nivel mundial ya que al atacar a la mayoría de cultivos produce grandes pérdidas económicas. *F. oxysporum* se transmite por el suelo y llega a toda la planta a través del xilema, esto provoca un bloqueo en los tejidos conductores e inhibe el paso del agua a las partes vitales de la planta (Li et al., 2022).

Se presentan manchas irregulares y oscuras que a futuro se convertirán en manchas cloróticas, posteriormente las hojas tomarán un color amarillento y se marchitarán sin desprenderse de la planta (Fassio et al., 2013).

Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Los microorganismos PGPR son reconocidos por su capacidad de mejorar el desarrollo y rendimiento de las plantas, además de actuar como un potencial controlador biológico de plantas y enfermedades (Dongmei et al., 2019). Se ha demostrado que los PGPR, son eficaces en la absorción de nutrientes de poca disponibilidad, pero esenciales en la nutrición de las plantas, como es el caso del hierro (Fe) (Rahimi et al., 2020). También mejora la transferencia de Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Zinc (Zn) desde la rizósfera a las hojas de las plantas y de esta manera reduce el estrés por salinidad del suelo en los cultivos (Ullah et al., 2022).

Bacillus subtilis

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

Promotor de crecimiento

Bacillus spp. es capaz de producir IAA, que estimula a la producción de reguladores de crecimiento, entre ellas las auxinas, lo que mejora las características de los diferentes indicadores de productividad del cultivo, su sistema radicular, el aumento del peso y biomasa de una planta (Kashyap et al., 2019).

Tahir, Gu, Wu, Raza, Hanif, et al. (2017) determinó que el peso en fresco, el peso en seco, el área foliar y la longitud de raíces y brotes de plantas de tomate aumentó en gran medida en las plantas sometidas a tratamiento con COVs producidos por *Bacillus subtilis* SYST2 en contraste con los controles. Además de esto se presentó un incremento de la tasa fotosintética y conductancia estomática comparado con los tratamientos del control.

Inducción a la resistencia sistémica

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

patógeno y con esto lograr cambios metabólicos que desemboquen en la expresión de genes de defensa (Kashyap et al., 2019).

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

Actividad antifúngica y antibacteriana

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

Posteriormente Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018) examinaron dos cepas de *Bacillus* y detectaron la presencia de genes de lipopéptidos y también genes de fengicina, iturrina y surfactina. Al evaluar el efecto antifúngico de *Bacillus* se determinó que del 76,2% al 100 de las células vivas y del 68,2% al 96,1% del sobrenadante presentaron actividad antifúngica.

Lyu et al. (2019) estudió el efecto de PGPR en asociación (*Pseudomonas spp* y *Bacillus spp.*) en el rendimiento del cáñamo, al usarlos para controlar las plagas y las enfermedades de la planta, especialmente contra el mildiu polvoso, otros estudios han demostrado que los PGPR como (*Azospirillum brasilense* , *Gluconacetobacter diazotrophicus* , *Herbaspirillum seropedicae* y *Burkholderia*

ambifaria) son eficientes contra *Fusarium oxysporum*, la enfermedad responsable la marchitez en las plantas de *C. sativa* tanto en preemergencia como post emergencia (Pellegrini et al., 2021).

Capítulo III

Materiales y Métodos

Ubicación geográfica del lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria en la Hacienda “El Prado” ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando

La Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, se encuentra a una altitud de 2750 msnm y geográficamente ubicada en las coordenadas $0^{\circ}, 23', 20''$ S y $78^{\circ}, 24', 44''$ O. Las condiciones ambientales del invernadero de Fitopatología presentan una temperatura media anual de $20,04^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 60%, en el laboratorio la temperatura media anual es de $16,3^{\circ}\text{C}$.

Figura 1

Visión satelital del lugar de estudio



Nota: A) Invernadero de Fitopatología, B) Laboratorio de Fitopatología (GoogleMaps, 2022)

Preparación de medios cultivo

Para el desarrollo de este estudio se utilizó medio NYDA formulado con una fuente nutritiva, extracto de levadura, dextrosa y agar, solución buffer (PBS), que contiene (27,2 g L⁻¹) KH₂PO₄, (34,8 g L⁻¹) K₂HPO₄, y medio MOLP (30 g L⁻¹) peptona, (20 g L⁻¹) sacarosa, (7 g L⁻¹) extracto de levadura, (7 g L⁻¹) minerales (Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

Preparación del inóculo de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

Se utilizaron dos cepas de *B. subtilis*, activadas y desarrolladas en un medio de bajo coste formulado con fuentes de nitrógeno y carbono, específicamente, harina de soya 40 g L⁻¹, melaza 2 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.9 g L⁻¹ y sales MOLP a una temperatura de 5°C y que posteriormente fueron subcultivados en medio NYDA a 30°C durante 24 horas (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Estas cepas se mantienen a -80°C en crio bolas para su uso a largo plazo (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018). Se prepararon las dosis de inóculo de células a una concentración de 2x10⁶ UFC para 1800 ml de agua, por cada una de las cepas.

Preparación de sobrenadante de *B. subtilis*

Para la extracción del sobrenadante de ambos formulados, primero se mezcló el contenido en un agitador orbital por 30 min, se dejó reposar el formulado por aproximadamente 2 horas para que se sedimenten las partículas sólidas.

Posteriormente, se separó la parte líquida del formulado y se llevó a tubos para centrifuga en donde se colocaron 50 ml de cada muestra de *B. subtilis* desarrollado en medio de bajo coste y se centrifugaron a 6000 RPM por 15 min para separar el sobrenadante de las células. Adicionalmente, el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm de poro en la membrana.

Finalmente, se colocó 120 ml de sobrenadante para 1200 ml de agua destilada correspondiente a los tratamientos T2 y T4, se agitó por 20 min en un agitador orbital y se llevó a campo para colocar 200 ml del tratamiento por cada planta.

Figura 2*Filtrado de sobrenadante*

Nota: Proceso de la extracción de sobrenadante para la preparación de tratamientos

Control de calidad de *B. subtilis* crecido en medio de bajo coste

Se tomó una muestra de 10 ml del medio de bajo coste inoculado y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 90 ml de solución buffer, para obtener la dilución 10^{-1} , a partir de esta dilución se preparó un banco de dilución, para esto, se añadió 1 ml de la muestra a 9 ml de solución buffer en tubos de ensayo hasta alcanzar una dilución 10^{-7} y, mediante plateo en medio NYDA e incubación a 30°C por 24h, se cuantificó la población viable en UFC ml^{-1} (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Este proceso se repitió cada 15 días con cada nuevo lote de inóculo.

La turbidez del sobrenadante se evaluó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 300 nm en intervalos de 30 min hasta completar 12 observaciones y de esta manera se construyó una curva de crecimiento, como blanco se usó el medio de cultivo líquido sin inocular.

Inoculación de *B. subtilis* en semilla de *C. sativa*

Se esterilizaron materiales para el establecimiento de una mini cámara de crecimiento, utilizando contenedores de plástico con tapa de 0.20 x 0.15 cm y papel filtro humedecido con agua destilada estéril.

Las semillas de *C. sativa* previamente desinfectadas con NaCl 1% por 3 min se sumergieron durante un período de 4 horas en medio de bajo coste inoculado con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 a una concentración de 1×10^6 UFC/ml, o su sobrenadante.

Posteriormente, se retiraron las semillas para ser distribuidas en las mini cámaras de crecimiento, que una vez etiquetadas se las colocó en cámaras de germinación a una temperatura de 16°C. Al séptimo día se evaluó el porcentaje de germinación y, una vez formada la radícula se colocaron en piloneras con sustrato de turba.

Figura 3

Disposición de las semillas en cámaras húmedas



Nota: Distribución de 3 repeticiones de 10 semillas de *C. sativa* colocadas en cámaras húmedas.

Establecimiento de plantas de *C. sativa* en invernadero

En el invernadero se establecieron cinco rizotrones (1.0 m de largo x 0,5 m de ancho x 0,5 m de profundidad). Se trasplantaron las plántulas de *C. sativa* una vez que presentaron de 2 a 3 hojas verdaderas y se colocaron de tal manera que sus raíces quedaron pegadas al vidrio del rizotrón.

Cada unidad tuvo tres repeticiones, es decir que estuvo conformada por 3 plántulas de cáñamo. Se incluyeron cinco tratamientos, dos inoculados con los sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, dos con la inoculados con células (2×10^6 UFC/ml) de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 y un control que recibió agua destilada.

Figura 4

Establecimiento del ensayo



Nota: Preparación del terreno y establecimiento de los 5 rizotrones previo al trasplante de las plántulas de cáñamo

Inoculación de *B. subtilis* en plantas de *Cannabis sativa*:

Plantas de *C. sativa* fueron inoculadas con suspensiones de célula o sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 de 72 horas formulado en el medio de bajo coste (Yáñez-Mendizábal et al., 2012) a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. La suspensión de células fue aplicada directamente en la base del tallo de las plantas a razón de 300 ml por cada planta en intervalos de 15 días, durante 3 meses. En el

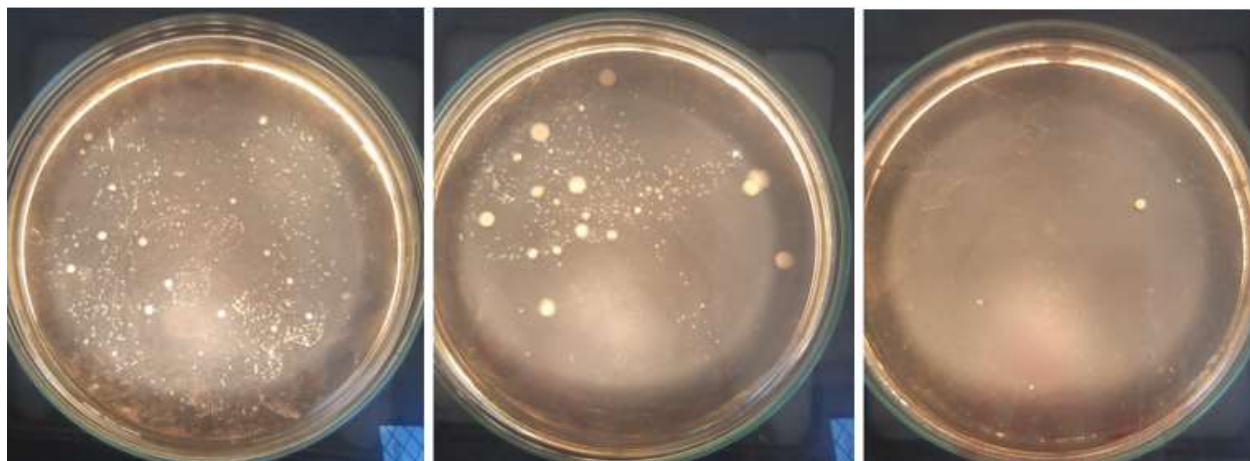
caso de los tratamientos con sobrenadante, la dosis aplicada fue fueron de 200 ml por cada planta, en el mismo intervalo de tiempo.

Dinámica poblacional

La evaluación de la dinámica poblacional, se realizó cada 15 días, durante 3 meses, a partir de muestras de suelo obtenidas de la rizósfera con ayuda de un barreno. Para esto, se colocó 10g de una muestra de suelo en 90 ml de PBS para obtener una dilución 10^{-1} , esta solución se homogenizó en un agitador orbital durante 15 min a 170 rpm, luego, se llevaron las muestras a baño maría a 80°C por 20 min para eliminar microorganismos contaminantes, luego se prepararon diluciones seriadas y se procedió a sembrar las muestras mediante la técnica de dilución y plateo en medio NYDA (Yáñez-Mendizábal et al., 2012), luego de 24 horas de incubación a 30°C se contaron las UFC formada en cada una de las caja con ayuda de un contador de colonias, de esta manera se determinó la población viable de UFC g^{-1} de suelo cada 15 días.

Figura 5

Conteo de colonias



Nota: Conteo de UFC en contador de colonias

Cuantificación de índice de contenido de clorofila y altura de planta

Se realizaron mediciones del índice de contenido de clorofila con la ayuda de un fluorómetro CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Science), cada 15 días en cada una de las plantas del ensayo.

Figura 6

Recolección de datos de clorofila



Nota: Toma de clorofila en plantas de cáñamo de 15 días de edad.

La altura se midió con un flexómetro desde la base del tallo hasta al centro de la parte apical de la planta.

Porcentaje de Humedad

Se midió el peso fresco de la raíz y la planta para evaluar el efecto promotor de crecimiento de *B. subtilis* (Qiao et al., 2017).

La relación de peso fresco y peso seco se determinó mediante el porcentaje de humedad de la plántula de cada tratamiento al finalizar el ensayo.

$$\%Humedad = \frac{Pi - Pf}{Pi} * 100$$

Donde:

Pi = es el peso inicial o peso fresco de la plántula

Pf = es el peso final o peso seco de la misma.

A los 90 días de la implementación del ensayo, se procedió a remover las plantas de cada uno de los tratamientos, con cuidado para no desprender la raíz. Se tomaron datos de la superficie de las misma y posteriormente se procedió a separar las hojas, el tallo y la raíz para cuantificar el peso fresco individual con ayuda de una balanza.

Se etiquetaron las plantas y se las llevó a la estufa a una temperatura de 72°C por 3 días, entonces se pesaron para determinar su peso seco.

Colonización de raíz

Para determinar la colonización de *B. subtilis* en la raíz de la planta de *C. sativa* se tomaron 10 gramos de la raíz de una planta al azar en cada uno de los tratamientos al final del ensayo, se colocó en 90 ml de solución buffer y se agitó vigorosamente, luego las muestras fueron llevadas a baño maría a 80°C por 20 minutos. Finalmente se sembraron las muestras por dilución y plateo en medio NYDA para determinar la concentración de la población bacteriana presente en las raíces.

Diseño experimental

Los tratamientos se establecieron en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial 2x2 con tres repeticiones y un testigo.

Se analizó el efecto de células y sobrenadante de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en 30 plantas de cáñamo (*C. sativa*) bajo condiciones de invernadero, se establecieron 15 unidades experimentales y 2 plantas de cáñamo como unidad muestral.

Tabla 1

Factores a evaluar

Factores		
Niveles	F1: Cepas de <i>B. subtilis</i>	F2: Tipo de inoculación
N1	<i>B. subtilis</i> Ctpx2-1	Células de <i>B. subtilis</i>
N2	<i>B. subtilis</i> Ctpx3-5	Sobrenadante libre de células de <i>B. subtilis</i>

Nota: Los factores expresados en la tabla corresponden a un DCA con arreglo bifactorial

Además, se empleó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + C_i + M_j + CM_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variables de respuesta

μ = Media general

C_j = Efecto de la i -ésima cepa de *B. subtilis*

M_j = Efecto de la j -ésima inoculación de células o sobrenadante

CM_{ij} = Efecto de la ij -ésima interacción de *B. subtilis* x células o sobrenadante

E_{ij} = Error experimental

Tabla 2

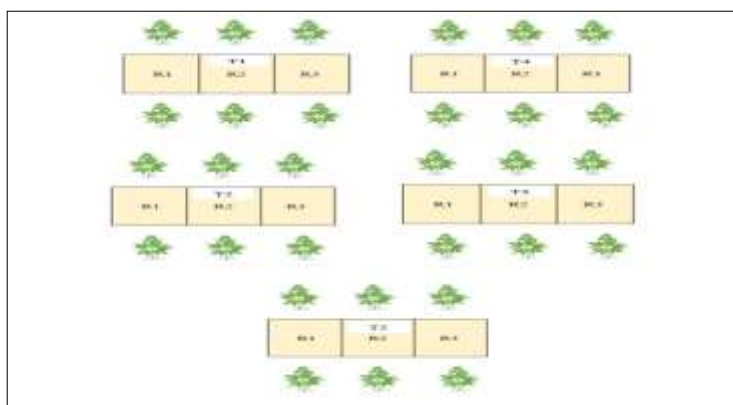
Tratamientos para la inoculación de B. subtilis en C. sativa

Tratamiento	Características
T1	Seis plantas de cáñamo inoculadas con células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx2-1
T2	Seis plantas de cáñamo inoculadas con sobrenadante libre de células <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx2-1
T3	Seis plantas de cáñamo inoculadas con células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx3-5
T4	Seis plantas de cáñamo inoculadas con sobrenadante libre de células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx3-5
T0 (Control)	Seis plantas de cáñamo inoculadas con agua destilada

Nota: Distribución de los inóculos para cada uno de los tratamientos de la investigación

Figura 7

Croquis del diseño experimental



Nota: Cada rizotróno representa un tratamiento, cada una de las divisiones representa una repetición conformada por dos plantas, para un total de 3 repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico

Las variables descritas anteriormente, fueron analizadas a través de estadística descriptiva con la finalidad de identificar el efecto de células y sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), una prueba de comparación de medias para determinar el efecto de los tratamientos aplicados sobre las variables altura, porcentaje de humedad, superficie radicular y contenido de clorofila para identificar el mejor tratamiento. Los datos fueron introducidos en el software estadístico INFOSTAT para su análisis a un nivel de significancia del 5%.

Capítulo IV

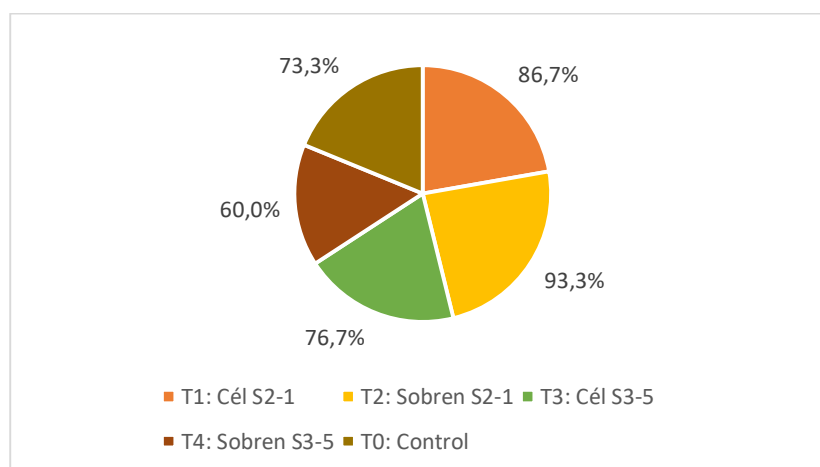
Resultados

Porcentaje de germinación

A continuación, se presentará los resultados obtenidos de la germinación de las semillas sometidas a los diferentes tratamientos, la Figura 8, representa el porcentaje de germinación de las semillas de cáñamo, de acuerdo al tratamiento aplicado. El porcentaje de germinación más alto se presentó en el T2 (sobrenadante de *B. subtilis* S2-1). Con un valor de 93.3% del total de las semillas tratadas, mientras que el menor porcentaje de germinación se presentó en el T4 (sobrenadante de *B. subtilis* S3-5) y en el T0 (control) con valores de 60% y 73.3% respectivamente. Las semillas tratadas con el inóculo de células *B. subtilis* S2-1 arrojan resultados favorables con un 86.7% de germinación.

Figura 8

Porcentaje de germinación de semillas de C. sativa



Nota: Gráfico de autoría

Altura de plantas de *C. sativa*

En la tabla 3, se puede evidenciar que indiferente a la aplicación de tratamientos, el crecimiento de las plantas de cañamo no presenta diferencias significativas sino a partir del día 30 hasta el día 90. Después del día 75, la tasa de crecimiento disminuye. Las plantas del T1 (Células de *B. subtilis* S2-1) presentaron el mayor índice de altura con una media de 86.68 cm, seguido del T3 (Células de *B. subtilis* S3-5) que presentaron una media de 85.25 cm a los 90 días. Además, se puede determinar que no existen diferencias significativas entre las medias de las alturas en los tratamientos inoculados con ambas cepas de *B. subtilis* desde el día 30 al día 90, de la misma manera los tratamientos T2, T4 y T0 no presentan diferencias significativas entre sí, pero existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos inoculados con las células de ambas cepas y los sobrenadantes de las mismas.

Si tomamos en cuenta el crecimiento de *C. sativa* con base en los tratamientos T0 (control), T2 y T4 (sobrenadantes de *B. subtilis*) podemos evidenciar que el testigo tiene una mayor media de altura con 77.97 cm a comparación de las plantas de los tratamientos inoculados con los sobrenadantes *B. subtilis* S 3-5 y S 2-1 que tienen una media de apenas 55.75 y 69.8 cm de altura respectivamente.

Tabla 3

Media \pm desviación estándar de la variable altura en plantas de C. sativa

Tratamiento	Altura de planta (cm)														
	Día 30			Día 45			Día 60			Día 75			Día 90		
	Media \pm D.E.			Media \pm D.E.			Media \pm D.E.			Media \pm D.E.			Media \pm D.E.		
T1: Células S2-1	16.15	\pm	4.41 ^a	43	\pm	4.9 ^a	69.97	\pm	14.59 ^a	80	\pm	17.44 ^a	86.68	\pm	17.33 ^a
T2: Sobren S2-1	12.15	\pm	1.95 ^{ab}	25	\pm	7.6 ^b	46	\pm	3.56 ^b	59	\pm	6.58 ^{ab}	69.88	\pm	8.82 ^{ab}
T3: Células S3-5	12.22	\pm	1.36 ^{ab}	38	\pm	5.3 ^a	67.48	\pm	16.37 ^a	80	\pm	15.73 ^a	85.25	\pm	19.35 ^a
T4: Sobren S3-5	12.22	\pm	1.98 ^{ab}	22	\pm	4.5 ^b	39.88	\pm	7.61 ^b	48	\pm	12.55 ^b	55.75	\pm	12.81 ^b
T0: Control	10.97	\pm	1.64 ^b	23	\pm	4.2 ^b	55.53	\pm	15.76 ^{ab}	61	\pm	12.61 ^{ab}	77.97	\pm	11.66 ^{ab}

Nota: Medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$) Los valores después del signo \pm corresponden a la desviación estándar de la media

Tabla 4

Análisis de varianza para la altura de plantas de cáñamo

		15 DDS			30 DDS			45 DDS			60 DDS			75 DDS			90 DDS		
		gl	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	
	Tratamiento	4	0.0525	s	0.0169	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s	0.0063	s			
Contrastes																			
Testigo vs Tratamientos (Células o Sobrenadantes S2-1, Células o Sobrenadantes S3-5)	C1	1	0.033	s	0.0655	ns	0.0018	ns	0.959	ns	0.3806	ns	0.5941	ns					
Cepa S2-1 vs Cepa S3-5	C2	1	0.5833	ns	0.072	ns	0.1117	ns	0.428	ns	0.3236	ns	0.2008	ns					
Inóculo Sobrenadante vs Inóculo Célula	C3	1	0.8906	ns	0.0633	ns	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s	0.0006	s					
Cepa (S2-1; S3-5) x Inóculo (Células - Sobrenadante)	C4	1	0.9726	ns	0.0633	ns	0.6837	ns	0.7279	ns	0.3194	ns	0.2939	ns					

Nota: Valores con $p > 0.0001$ son no significativos

En la tabla 4 se puede apreciar significancia a partir del día 15 con respecto a la interacción Testigo vs Tratamientos ($F=2,72$; $p=0.03$). A partir del día 45, la diferencia significativa de la interacción entre el inóculo de células de *B. subtilis* S 3-5 y S 2-1 y sus sobrenadantes se mantuvo en el tiempo hasta el día 90 ($F=4.61$, $p=0,006$) lo que demuestra un mayor crecimiento de *C. sativa*, en los tratamientos inoculados con células a comparación de los tratamientos tratados con sobrenadantes y el control.

Cuantificación de Clorofila

Tabla 5

Media ± desviación estándar de la variable índice del contenido de clorofila en plantas de C. sativa

Tratamiento	Índice del contenido de clorofila (SPAD)											
	Día 15		Día 30		Día 45		Día 60		Día 75		Día 90	
	Media ± D.E.		Media ± D.E.		Media ± D.E.		Media ± D.E.		Media ± D.E.		Media ± D.E.	
T1: Células S2-1	5.98	± 2.21 ^{ab}	19.43	± 2.98 ^{ab}	32.68	± 4.06 ^a	42.3	± 4.45 ^a	50.4	± 3.37 ^a	47.83	± 7.71 ^a
T2: Sobren S2-1	4.2	± 0.95 ^{bc}	14.88	± 1.6 ^b	23.9	± 1.97 ^b	31.48	± 2.36 ^{bc}	37.77	± 2.79 ^{bc}	34.3	± 3.72 ^b
T3: Células S3-5	7.02	± 1.03 ^a	20.4	± 2.89 ^a	34.72	± 2.7 ^a	42.18	± 2.21 ^a	52.22	± 2.55 ^a	49.7	± 3.39 ^a
T4: Sobren S3-5	3.57	± 1.28 ^c	15.4	± 4.21 ^b	20.52	± 3.67 ^b	27.52	± 3.78 ^c	33.22	± 3.63 ^c	28.73	± 3.38 ^b
T5: Control	4.78	± 0.48 ^{abc}	16.23	± 1.77 ^{ab}	24	± 1.26 ^b	33.5	± 2.11 ^b	40.15	± 2.80 ^b	37.1	± 5.42 ^b

Nota: Medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$). Los valores después del signo \pm corresponden a la desviación estándar de la media

En la tabla 5 se observa el aumento constante del índice de clorofila en las hojas hasta el día 75, el mayor porcentaje de clorofila se evidenció en el T1 y T3 que corresponden al inóculo con células de ambas cepas, esto, seguido del T0 (control) con un contenido de clorofila de 37.1 SPAD y finalmente de los sobrenadantes con un contenido bajo de clorofila. En el caso del tratamiento con las células de *B. subtilis* S 3-5 su media final fue de 49.7 SPAD y en tratamiento con las células S 2-1 la media final fue 47.8 SPAD, representando los valores más altos de contenido de clorofila en la planta.

Tabla 6

Análisis de varianza para el índice del contenido de clorofila de las plantas de cáñamo

		15 dds		30 dds		45 dds		60 dds		75 dds		90 dds		
		gl	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s	p valor	ns/s
	Tratamiento	4	0.0009	s	0.0066	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s
	Contraste													
Testigo vs Tratamientos	C1	1	0.5040	ns	0.3289	ns	0.0066	ns	0.1096	ns	0.0280	ns	0.1954	ns
(Células o Sobrenadantes														
S2-1, Células o														
Sobrenadantes S3-5)														
Cepa S2-1 vs Cepa S3-5	C2	1	0.7135	ns	0.5297	ns	0.5769	ns	0.1228	ns	0.2832	ns	0.3743	ns
Inóculo Sobrenadante vs	C3	1	<0.0001	s	0.0004	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s
Inóculo Célula														
Cepa (S2-1; S3-5) x	C4	1	0.1344	ns	0.8483	ns	0.0322	ns	0.1446	ns	0.0171	ns	0.0812	ns
Inóculo (Células -														
Sobrenadante)														

Nota: Valores con $p > 0.0001$ son no significativos

En la variable índice del contenido de clorofila se aprecia significancia entre la interacción de los tratamientos Inóculo vs Célula ($F=6.65$, $p>0.0001$) a partir del día 15 hasta el día 90 después de la siembra, esto indica que la presencia de células aplicadas en el suelo tiene una importancia representativa en la producción de clorofila en las plantas de *C. sativa*.

Peso fresco y peso seco

En esta sección se presentan los resultados provenientes de la evaluación de los pesos en fresco y seco de las partes individuales que conforman la planta de *C. sativa*.

En cuanto al peso fresco podemos corroborar que los mejores tratamientos son T1 y T3 (inoculaciones con células de *B. subtilis* S 3-5 y S 2-1) sin presencia de una diferencia significativa entre las cepas. Se puede observar que, en el caso del peso fresco, las hojas y tallos del T1 presentan el valor más alto con medias de 45.62 g en hojas y 58.42, no obstante, para la raíz, mejor tratamiento es el inoculado con células de *B. subtilis* S3-5 (T3) con un peso de 20.28 g. Por otro lado, los tratamientos T2 y T4 demostraron valores inferiores incluso a comparación del testigo.

Los valores arrojados demuestran que en los valores de peso seco, en el caso de los tallos que el mejor tratamiento son las células de la cepa S2-1 con 12.38 g, en lo que respecta al peso seco de raíz y hojas, no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, pero en ambos casos los valores más altos corresponden al tratamiento que fue inoculado con células de *B. subtilis* S3-5, dónde el mejor la raíz muestra una media de 5.39 g y una media de 11.92 gramos para las hojas, lo que representa un 57.6% más peso a comparación del tratamiento testigo (Tabla 7).

Tabla 7

Media \pm desviación estándar de la variable peso fresco y peso seco de plantas de *C. sativa*

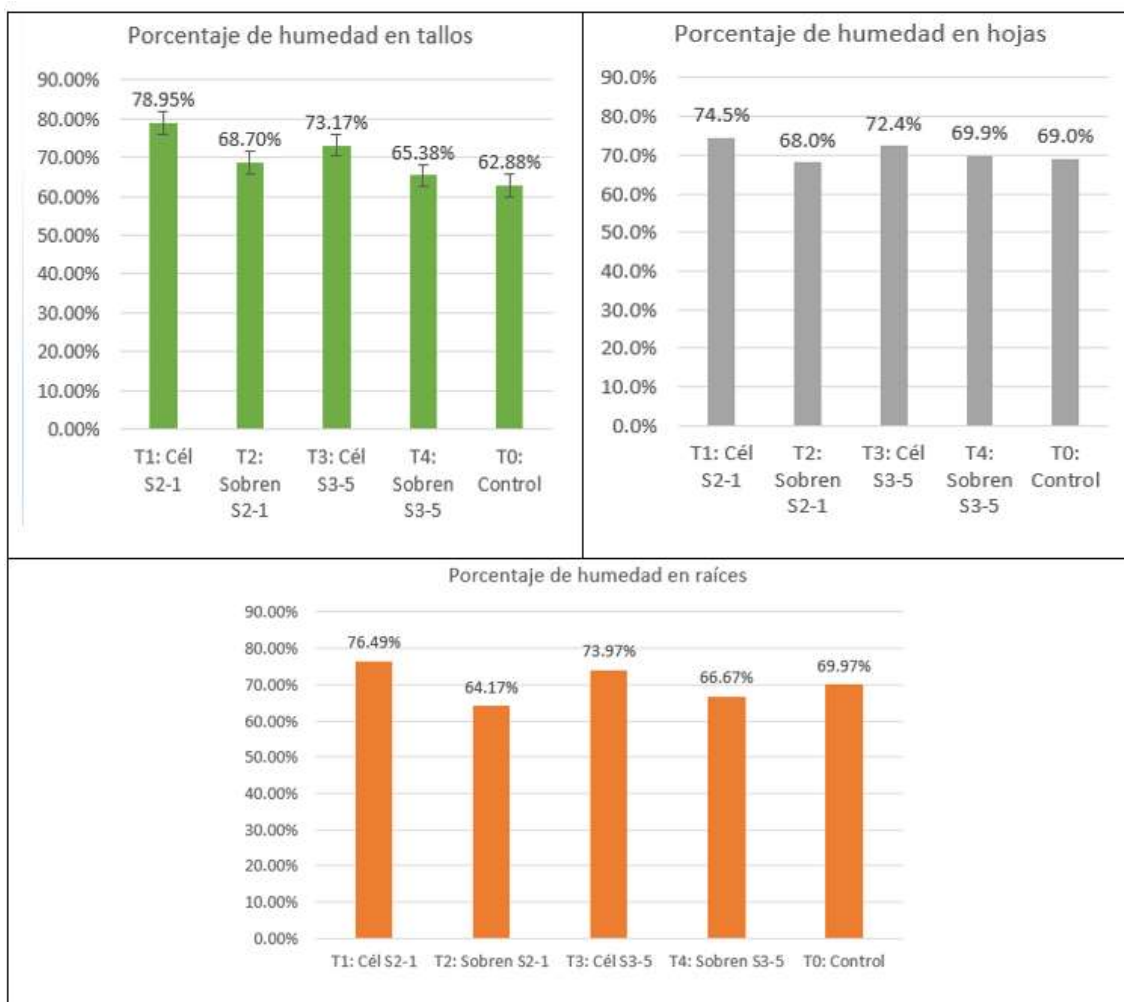
Tratamiento	Peso fresco						Peso seco					
	Tallo		Raíz		Hojas		Tallo		Raíz		Hojas	
	Media \pm D.E.		Media \pm D.E.		Media \pm D.E.		Media \pm D.E.		Media \pm D.E.		Media \pm D.E.	
T1: Célula S2-1	58.42	\pm 17.64 ^b	11.85	\pm 8.05 ^{ab}	45.62	\pm 20.76 ^a	12.38	\pm 4.34 ^b	2.87	\pm 2.28 ^a	11.67	\pm 5.43 ^a
T2: Sobren S2-1	23.85	\pm 9.53 ^a	7.25	\pm 3.84 ^a	27.88	\pm 10.63 ^{ab}	7.25	\pm 2.37 ^a	2.57	\pm 1.41 ^a	8.75	\pm 3.12 ^a
T3: Célula S3-5	52.83	\pm 20.85 ^b	20.28	\pm 9.45 ^b	43.67	\pm 24.06 ^a	11.22	\pm 2.99 ^{ab}	5.39	\pm 3.01 ^a	11.92	\pm 6.95 ^a
T4: Sobren S3-5	17.44	\pm 5.4 ^a	7.71	\pm 3.48 ^a	35.57	\pm 9.89 ^b	6.40	\pm 2.03 ^a	2.90	\pm 2.38 ^a	10.55	\pm 2.83 ^a
T5: Control	24.17	\pm 9.32 ^a	14.13	\pm 7.4 ^{ab}	21.87	\pm 5.6 ^b	8.08	\pm 2.21 ^{ab}	3.90	\pm 1.81 ^a	6.86	\pm 2.46 ^a

Nota: Medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$). Los valores después del signo \pm corresponden a la desviación estándar de la media.

Porcentaje de Humedad

Figura 9

Porcentaje de humedad en tallos, hojas y raíces de *C. sativa*



Nota: Gráfico de autoría

Dentro del porcentaje de humedad de la planta, se aprecia que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, pese a esto, se evidencia un mayor porcentaje de humedad en las plantas que fueron tratadas con el inóculo de células de ambas cepas, es decir los tratamientos T1 y T3 con valores de 78.95% y 73.17% respectivamente, con respecto al peso de los tallos. En el caso de las

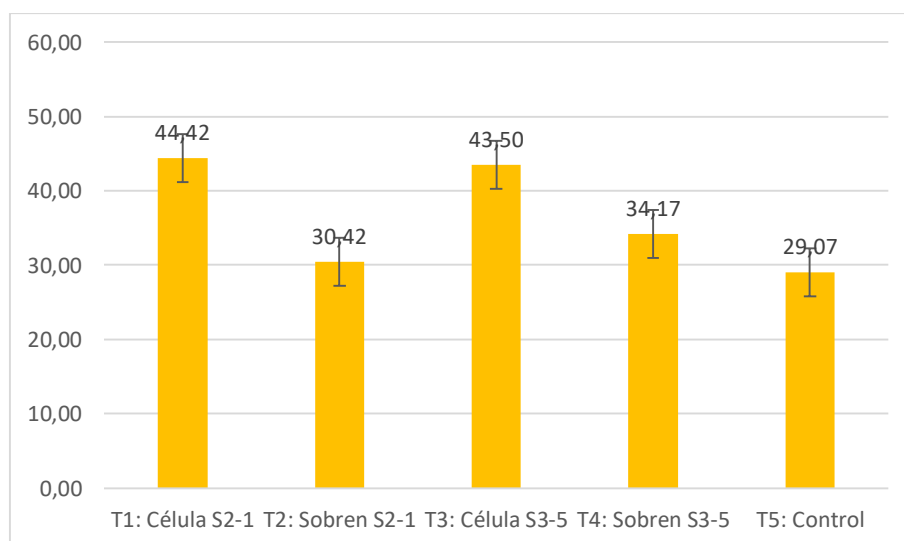
hojas los resultados son similares 74.5% es el valor más alto correspondiente al T1, seguido de T3 con un valor de 72.4%. El mayor porcentaje de humedad en las raíces de la planta también se ve representado por los tratamientos inoculados con células el T1 y T3 mantienen valores de 76.49% y 73.97% respectivamente, en este caso, el tratamiento control superó los valores arrojados por los pesos de los tratamientos inoculados con el sobrenadante de ambas cepas.

Longitud de raíz

Al final del estudio, las plantas de *C. sativa* fueron extraídas en su totalidad, y se realizaron mediciones de la longitud final de las raíces de cada una de las plantas en los tratamientos. Los resultados se aprecian en la siguiente figura.

Figura 10

Longitud de raíz de las plantas de C. sativa



Nota: Gráfico de autoría

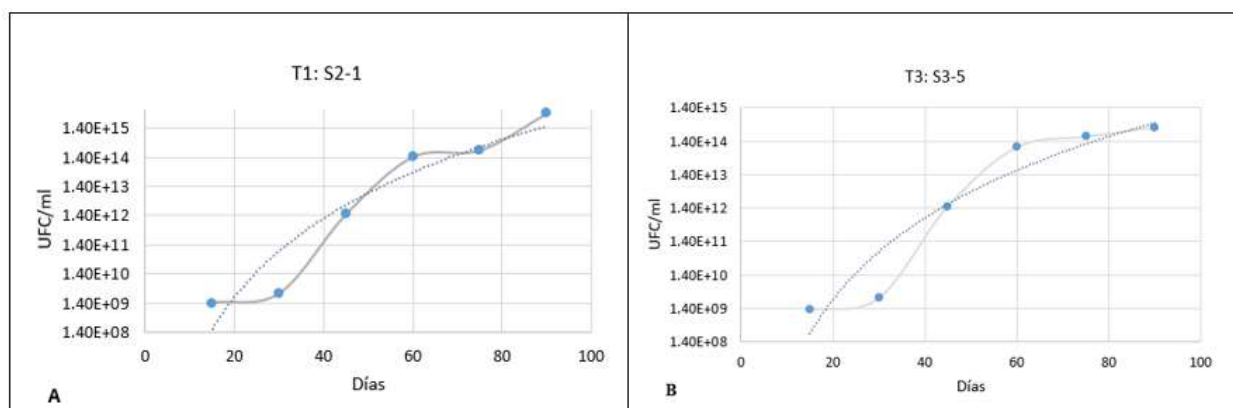
En la longitud de raíz de las plantas de cáñamo observamos una pronunciada diferencia significativa entre las raíces que fueron tratadas con las células de las cepas S2-1 y S3-5 y el tratamiento

testigo. Los mejores tratamientos fueron T1 y T3 (célula *B. subtilis* S2-1 y S3-5) con valores muy similares, 44.42 cm y 43.50 cm respectivamente.

Dinámica poblacional y colonización de raíz

Figura 11

Curva de crecimiento de *B. subtilis* Ctpx S-1 y S3-5



Nota: A) curva de crecimiento de *B. subtilis* S2-1 B) curva de crecimiento de *B. subtilis* S3-5

Al realizar la cuantificación en el tiempo se encontró que la concentración de ambas cepas de *B. subtilis* no aumentaron significativamente su concentración, a partir del día 45 se reportó aumentos en la población de *B. subtilis*, la cepa S2-1 presentó una concentración de 1.6×10^{12} UFC/ml y la cepa S3-5 se encontró con 1.5×10^{12} UFC/ml. Para el día 75 ambas cepas se mantuvieron en concentraciones similares 2×10^{14} UFC/ml. Sin embargo, al día 90 se puede apreciar que la cepa S2-1 aumenta en 4.6×10^{15} , mientras que la cepa S3-5 alcanza las 3.7×10^{14} ufc/ml lo que sugiere una posible estabilización de la población bacteriana (Figura 11b)

Capítulo V

Discusión

B. subtilis, ha sido objeto de estudio en una variedad de cultivos, en diferentes etapas de desarrollo, Tabatabaei et al. (2018) mencionan que el ácido indol-3-acético (IAA) aplicado de forma exógena mostró un efecto dependiente de la concentración, sobre los atributos de germinación de las semillas y la actividad de la α -amilasa en trigo, lo que concuerda con la posibilidad de que el efecto inhibitor de la inoculación bacteriana sobre la germinación de las semillas fuera consecuencia del IAA producido por la bacteria. De acuerdo a lo mencionado, se establece que células y sobrenadantes de *B. subtilis* S 2-1 y S 3- 5 contienen diferentes concentraciones de IAA lo que afectó significativamente al proceso de germinación en los diferentes tratamientos y se pone a consideración que el T2 (sobrenadante *B. subtilis* S2-1) (Figura 8) tiene las concentraciones más adecuadas para inducir de manera positiva en la germinación de semillas de *C. sativa*.

Si comparamos el crecimiento de las plantas de *C. sativa* inoculadas con los tratamientos de sobrenadantes con el tratamiento control, se puede evidenciar que las plantas del tratamiento control presenta mayor altura que los tratamientos 2 y 4 con un crecimiento de 77.9 cm a los 90 días, mientras que los tratamientos T2 y T4 crecieron 55.75 y 69.8 cm respectivamente. Bharucha et al. (2013) señalan que la promoción del crecimiento depende del equilibrio entre las auxinas y otras fitohormonas. La presencia de triptófano, ácido jasmónico y sideróforos en el medio de cultivo puede mejorar la producción de auxinas y por lo tanto regular la promoción de crecimiento. Además, Liu et al. (2013) menciona que las cepas de *B. subtilis* tienen un efecto promotor de crecimiento, porque pueden producir distintas concentraciones de metabolitos secundarios. Esto sugiere, que las concentraciones de auxinas presentes en los sobrenadantes de *B. subtilis*, no son suficientes para inducir un crecimiento adecuado de plantas de *C. sativa* y al no tener células que mantengan la actividad microbiana, estas fitohormonas no se pueden regular, lo que repercute directamente en el crecimiento de la planta.

No existió diferencia significativa entre los tratamientos de células S2-1 y S3-5 (Tablas 3 y 4), sin embargo, al compararlas con los tratamientos con sobrenadantes y control, las plantas inoculadas con los tratamientos de suspensión celular presentaron mayor crecimiento en plantas de *C. sativa* a partir de los 30 días de establecido el estudio bajo invernadero. Samaras et al. (2021) concluyeron que, a los 35 días en condiciones de invernadero, las aplicaciones de *B. subtilis* MBI 600 dieron como resultado un aumento significativo en la altura de los brotes, la longitud de las raíces y el peso fresco de los brotes de plantas de cucumber en comparación con las plantas del tratamiento control.

El valor más alto en longitud de raíz se obtuvo con el tratamiento T1 (célula *B. subtilis* S2-1) con una media de 44.42 cm de largo a comparación del resto de tratamientos (Figura 10). Es importante mencionar que las células de *B. subtilis* S 3-5 y S 2-1, mantuvieron saludable a la raíz de *C. sativa* además de proporcionarle regularmente, cierto tipo de metabolitos secundarios como las auxinas (IAA) hormonas que promueven el crecimiento de la raíz, como mencionan (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021), ya que el crecimiento de raíces y brotes en plántulas de chocho andino tratadas con CtpxS2-1 aumentaron significativamente debido al control de enfermedades, al igual que la síntesis de la defensa enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa.

El mejor tratamiento para el índice del contenido de clorofila, fue el T3 (Células *B subtilis* S3-5) (Tabla 5 y 6), con un contenido de clorofila de 49.8 SPAD a comparación del tratamiento control que presentó valores de 37.1 SPAD, evidenciando una diferencia de contenido de clorofila de 12.7 SPAD. Pagnani et al. (2018) Compararon dos biofertilizantes fortificados con PGPR en plantas de *C. sativa* "Finola", el primero a una concentración de 1×10^6 células por mililitro de consorcio bacteriano, el segundo con 1×10^7 células por mililitro y para el control se hizo uso de fertilizante nitrogenado, se encontró que en el inóculo con biofertilizantes bacteriano promovió que las plantas presentaran una media con 10 SPAD más que el control en cuanto al contenido de clorofila. Corroborando la similitud con los resultados obtenidos en esta investigación.

Anguiano Cabello et al. (2019), estudiaron tres cepas de *B. subtilis* (BSN, BS14 y BS8) en plantas de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*, al determinar el porcentaje de humedad en tallos, hojas y raíces de las mismas no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos y los testigos.

Capítulo VI

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- Las células de ambas cepas de *B. subtilis* mejoran la promoción del crecimiento en *C. sativa* debido a la producción constante de metabolitos secundarios que son capaces de generar, como los sideróforos que ayudan a quelatizar macro y micro elementos, lo que ayuda a las plantas a absorber nutrientes con mayor facilidad, y hormonas como el ácido indolacético y la hormona citoquinina que contribuyen a promover el crecimiento de la planta. El uso únicamente de sobrenadantes, no tuvo mayor efecto en el crecimiento de las plantas de *C. sativa*, esto se debe a que, al no existir actividad bacteriana, los metabolitos secundarios son casi nulos y las concentraciones de hormonas inexactas y poco eficientes en su desarrollo.
- El estudio de dinámica poblacional demostró que tanto *B. subtilis* Ctpx S2-1 como *B. subtilis* Ctpx S3-5 se adaptaron a las condiciones de la rizósfera donde fueron inoculados, además incrementaron considerablemente su población en el tiempo.
- Las cepas S2-1 y S3-5 de *B. subtilis* colonizaron exitosamente las raíces de las plantas de *C. sativa* en los tratamientos 1 y 3, además, *B. subtilis* es capaz de producir surfactinas lo que aumentó la sanidad en las raíces de dichos tratamientos.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar un estudio del efecto de *B. subtilis* S2-1 y S3-5, en asociación con otros PGPR para evaluar la interacción de los mismos en el desarrollo de diferentes cultivos.
- Se recomienda evaluar la eficiencia y compatibilidad de ambas cepas de *B. subtilis* al ser aplicadas conjuntamente con productos químicos.

- Cuantificar la cantidad de hormonas (auxinas y citoquininas) producidas a través del tiempo por *B. subtilis* Ctpx S2-1 y Ctpx S3-5 y determinar la dosis adecuada que induce al crecimiento de las plantas.

Bibliografía

- Amaducci, S., Zatta, A., Raffanini, M., & Venturi, G. (2008). Characterisation of hemp (*Cannabis sativa* L.) roots under different growing conditions. *Plant and Soil*, 313(1–2), 227–235.
<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9695-0>
- Ángeles, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., Ventura Martínez, R., Guadalupe, D., & Ángeles López, E. (2015). REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS. *Rev Mex Cienc Farm*, 45(4), 2014.
- Anguiano Cabello, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., Laredo Alcalá, E. I., Anguiano Cabello, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., & Laredo Alcalá, E. I. (2019). Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth. *Revista Bio Ciencias*, 6, 418.
<https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.E418>
- Bharucha, U., Patel, K., & 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/TABLES/2>
- Cabello, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., Laredo Alcalá, E. I., Anguiano Cabello, J. C., Flores Olivas, A., Olalde Portugal, V., Arredondo Valdés, R., & Laredo Alcalá, E. I. (2019). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6, 418. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.E418>
- Crini, G., Lichtfouse, E., Chanut, G., & Morin-Crini, N. (2020). Applications of hemp in textiles, paper industry, insulation and building materials, horticulture, animal nutrition, food and beverages, nutraceuticals, cosmetics and hygiene, medicine, agrochemistry, energy production and environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(5), 1451–1476.
<https://doi.org/10.1007/s10311-020-01029-2>

- Dongmei, L., Backer, R., Robinson, W. G., & Smith, D. L. (2019). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Cannabis Production: Yield, Cannabinoid Profile and Disease Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1761. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01761>
- Fassio, A., Rodríguez, marcelo J., Ceretta, S., Estanzuela, L., & agr mSc, I. (2013). *Plagas y enfermedades del Cáñamo (Cannabis sativa L.)*.
- Flint, M. (2015). *Integrated Pest Management for Homes, Gardens, and Landscapes Whiteflies Statewide Integrated Pest Management Program P EST N OTES Publication 7401 Figure 1. Adult greenhouse whiteflies on undersides of leaves. Figure 2. Sweetpotato whitefly adults and nymphs.*
- Gunasekera, B., Davies, C., Martin-Santos, R., & Bhattacharyya, S. (2021). The Yin and Yang of Cannabis: A Systematic Review of Human Neuroimaging Evidence of the Differential Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, *6*(6), 636–645. <https://doi.org/10.1016/J.BPSC.2020.10.007>
- Kashyap, B. K., Solanki, M. K., & Pandey, A. K. (2019). Plant Health Under Biotic Stress. *Plant Health Under Biotic Stress*, 219–236. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4>
- LASA. (2021). *El cannabis: un mercado de expansión en el Ecuador – Laboratorio Lasa*. <https://laboratoriolasa.com/el-cannabis-un-mercado-de-expansion-en-el-ecuador/>
- Li, L., Zhu, T., Song, Y., Feng, L., Kear, P. J., Riseh, R. S., Sitohy, M., Datla, R., & Ren, M. (2022). Salicylic acid fights against Fusarium wilt by inhibiting target of rapamycin signaling pathway in Fusarium oxysporum. *Journal of Advanced Research*, *39*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2021.10.014>
- Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H. Q., Luan, S., Li, J., & He, Z. H. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(38), 15485–15490. https://doi.org/10.1073/PNAS.1304651110/SUPPL_FILE/PNAS.201304651SI.PDF

- López, P., Pekas, A., Stubsgaard, L., Sancho Blanco, G., Lütken, H., & Sigsgaard, L. (2022). Glandular trichomes affect mobility and predatory behavior of two aphid predators on medicinal cannabis. *Biological Control*, *170*, 104932. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.104932>
- Lyu, D., Backer, R., Robinson, W. G., & Smith, D. L. (2019). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Cannabis Production: Yield, Cannabinoid Profile and Disease Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1761. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01761>
- Mishchenko, S., Mokher, J., Laiko, I., Burbulis, N., Kyrychenko, H., & Dudukova, S. (2017). Phenological growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.): codification and description according to the BBCH scale. *Žemės Ūkio Mokslai*, *24*(2). <https://doi.org/10.6001/zemesukiomokslai.v24i2.3496>
- Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., Stagnari, F., Sergi, M., Lo Sterzo, C., Pisante, M., & Del Gallo, M. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial Crops and Products*, *123*, 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.06.033>
- Pellegrini, M., Ercole, C., Gianchino, C., Bernardi, M., Pace, L., & Del Gallo, M. (2021). Article fusarium oxysporum f. Sp. cannabis isolated from cannabis sativa l.: In vitro and in planta biocontrol by a plant growth promoting-bacteria consortium. *Plants*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10112436/S1>
- Qiao, J., Yu, X., Liang, X., Liu, Y., Borriss, R., & Liu, Y. (2017). Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1039-x>
- Quinatoa, N. (2015). "EVALUACIÓN DEL CONTROL DE BOTRYTIS (*Botrytis cinérea*) EN EL CULTIVO DE MORA (*Rubus glaucus* Benth) MEDIANTE EL USO DE TRICHODERMA Y EMAS EN LA COMUNIDAD DE MISQUILLÍ DE LA PARROQUIA SANTA ROSA, PROVINCIA DE TUNGURAHUA."

- Rahimi, S., Talebi, M., Baninasab, B., Gholami, M., Zarei, M., & Shariatmadari, H. (2020). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in improving iron acquisition by altering physiological and molecular responses in quince seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *155*, 406–415.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.07.045>
- Samaras, A., Nikolaidis, M., Antequera-Gómez, M. L., Cámara-Almirón, J., Romero, D., Moschakis, T., Amoutzias, G. D., & Karaoglanidis, G. S. (2021). Whole Genome Sequencing and Root Colonization Studies Reveal Novel Insights in the Biocontrol Potential and Growth Promotion by *Bacillus subtilis* MBI 600 on Cucumber. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 3437.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.600393/BIBTEX>
- Sarmiento, C., & Maldonado, J. (2013). *UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA SEDE CUENCA CARRERA DE INGENIERIA AMBIENTAL*.
- Sordo, L., & Gual, A. (2022). Cannabis recreativo y cannabinoides terapéuticos, ni mezclados ni agitados. *Gaceta Sanitaria*. <https://doi.org/10.1016/J.GACETA.2022.03.009>
- Struik, P. C., Amaducci, S., Bullard, M. J., Stutterheim, N. C., Venturi, G., & Cromack, H. T. H. (2000). Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*, *11*(2–3), 107.
[https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00048-5)
- Tabatabaei, S., Ehsanzadeh, P., Etesami, H., Alikhani, H., & Glick, B. (2018). *Indole-3-acetic acid (IAA) producing Pseudomonas isolates inhibit seed germination and α -amylase activity in durum wheat (Triticum turgidum L.) - Dialnet*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6806082>
- Tahir, Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Safdar, A., Huang, Z., Rajer, F. U., & Gao, X. (2017). Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus volatiles*. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12870-017-1083-6>

- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. V., & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>
- Taylor, P., Karus, M., & Kaup, M. (2002). Natural fiber composites in the European automotive industry. *Journal of Industrial Hemp*, January 2015, 9-12 ST-Natural fiber composites in the Europea. <https://doi.org/10.1300/J237v07n01>
- Ullah, S., Bano, A., Asadullah, Shahidnd, M. A., & Khan, N. (2022). A comparative study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and sowing methods on nutrient availability in wheat and rhizosphere soil under salinity stress. *Rhizosphere*, 23, 100571. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2022.100571>
- Wimalasiri, E. M., Jahanshiri, E., Chimonyo, V. G. P., Kuruppuarachchi, N., Suhairi, T. A. S. T. M., Azam-Ali, S. N., & Gregory, P. J. (2021). A framework for the development of hemp (*Cannabis sativa* L.) as a crop for the future in tropical environments. *Industrial Crops and Products*, 172(December 2020), 113999. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113999>
- Yáñez-Mendizábal, & 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-Mendizábal, & 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-Mendizábal, Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- <https://drive.google.com/drive/u/4/folders/18QzQAWhl-Ea7srMSpuNQdSchwNsX5rwh>