

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 de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

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

Ing. Falconí Saá, César Eduardo PhD.

15 de agosto del 2022



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 cannabinoides.



El cáñamo, llega a producir hasta 25 t de materia seca por hectárea de los cuales 20 t provienen de su tallo.

Bacillus subtilis es una rizobacteria promotora del crecimiento (PGPR) de las plantas a través de métodos directos e indirectos a través de metabolitos como fitohormonas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos



(Amaducci et al., 2008; Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018)



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).

(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).

Tomando en cuenta la versatilidad de la bacteria y la necesidad de aumentar los rendimientos 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

General

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

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.



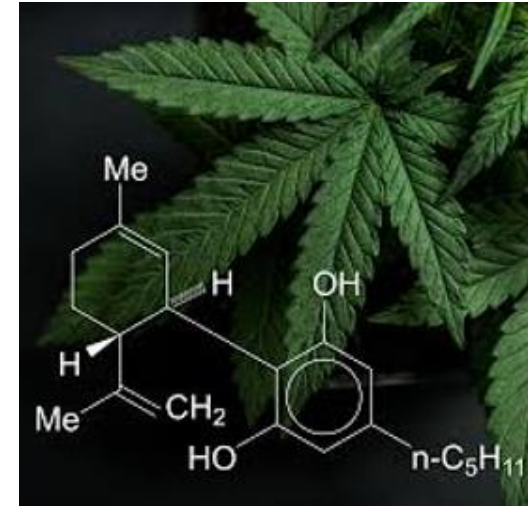
Hipótesis

- 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.



C. Sativa

El cáñamo es un cultivo industrial con 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.



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

Se ha detectado la existencia de flavonoides responsables del mecanismo de defensa de las plantas de *C. sativa*.

(Wimalasiri et al., 2021; Gunasekera et al., 2021; Ángeles et al., 2015).



Situación legal del Cáñamo en el Ecuador

El 17 de septiembre del 2019 la Asamblea Nacional del Ecuador aprobó la reforma del COIP para el uso del cannabis con fines textiles, medicinales o terapéuticos.

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 industrial

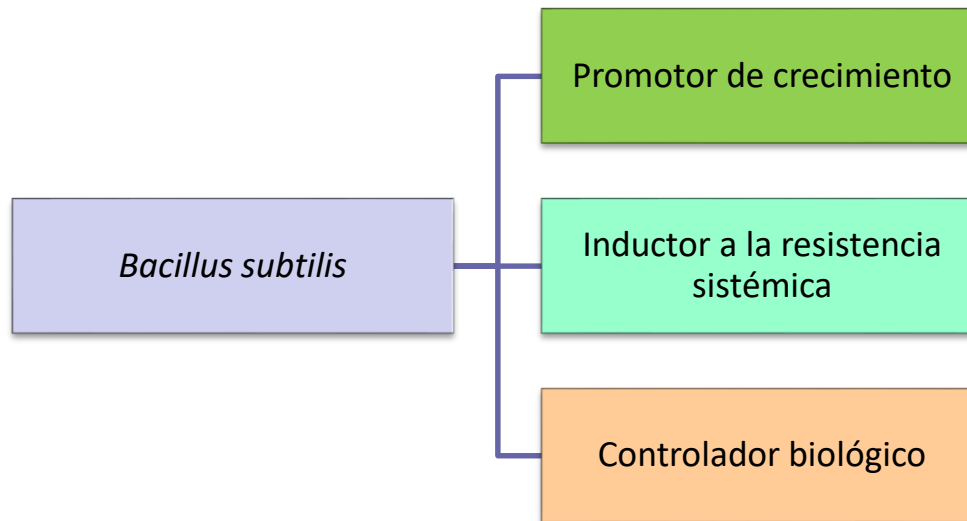
Acuerdo Ministerial No. 141 se detallan las tarifas a pagar por cada licencia que sea solicitada por el interesado de acuerdo a su necesidad como la importación, siembra, producción, procesamiento, comercialización, adquisición, exportación de cannabis de uso industrial

(LASA, 2021)



Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Microorganismos reconocidos por su capacidad de mejorar el desarrollo y rendimiento de las plantas, además de actuar como un potencial controlador biológico de plagas y enfermedades, son eficaces en la absorción de nutrientes de poca disponibilidad.

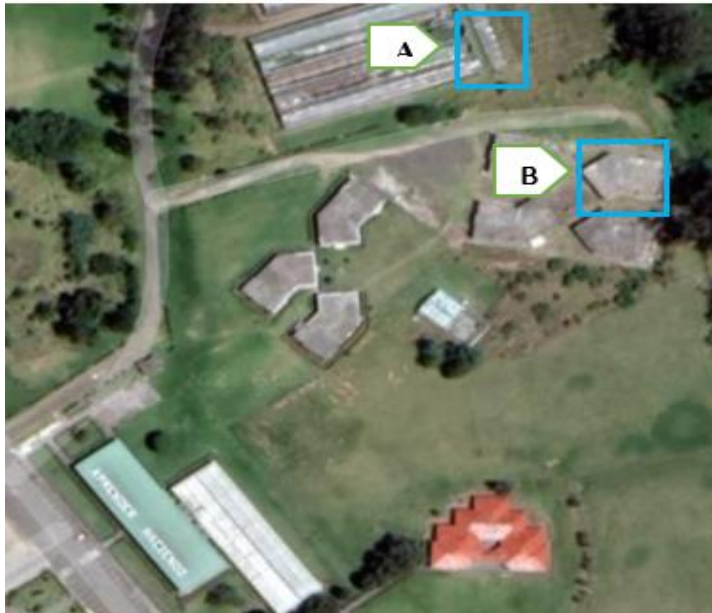


(Ullah et al., 2022; Kashyap et al., 2019; Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021)



Ubicación geográfica del lugar de investigación

Figura 1. *Visión satelital del área de estudio*



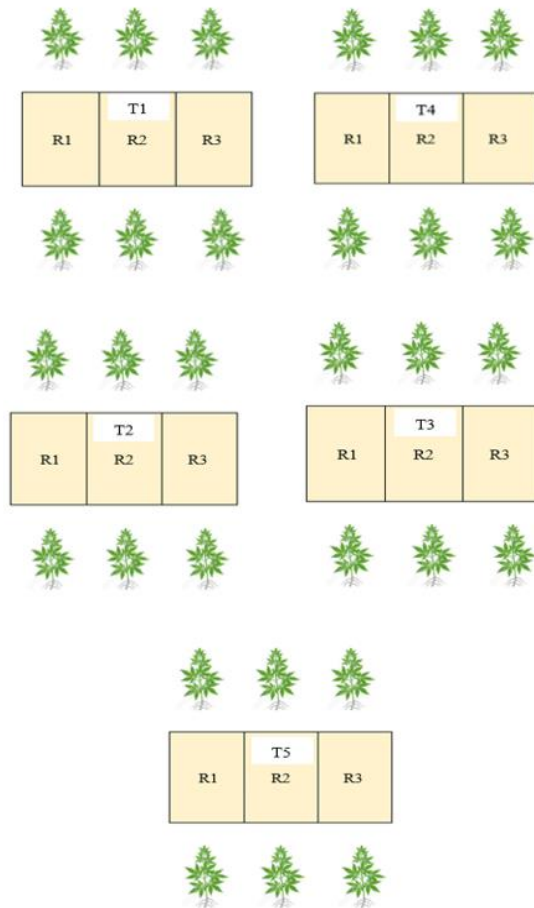
Nota: A) Invernadero de Fitopatología, B) Laboratorio de Fitopatología (Google Maps, 2022)

Provincia: Pichincha
Cantón: Rumiñahui
Sector: San Fernando
Latitud: 0°23'27.98" S
Longitud: 78°,24'44" O

Las condiciones ambientales del invernadero de Fitopatología presentan una temperatura media anual de 20,04 °C y humedad relativa de 60%, en el laboratorio la temperatura media anual es de 16,3 °C

Diseño experimental

Figura 7. Croquis del Diseño experimental



Los tratamientos se establecieron en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial 2x2 con tres repeticiones y un testigo, se establecieron 15 unidades experimentales y 2 plantas de cañamo como unidad muestral.

Tabla 2. Tratamientos para la inoculación de *B. subtilis* en *C. sativa*

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

Nota: Los factores evaluados serán el tipo de inóculo y la cepa de *B. subtilis*

Preparación de medios de cultivo

- NYDA
- Solución Buffer



Preparación de inóculos

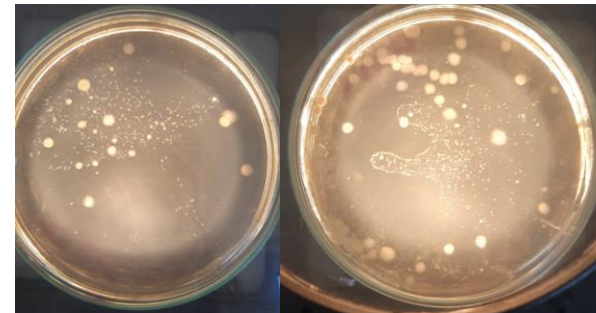
- Tratamientos células y sobrenadantes



Extracción de sobrenadantes



Control de Calidad de *B. subtilis*





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

- Preparación del terreno
- Ubicación de los rizotrones

Establecimiento del ensayo en campo

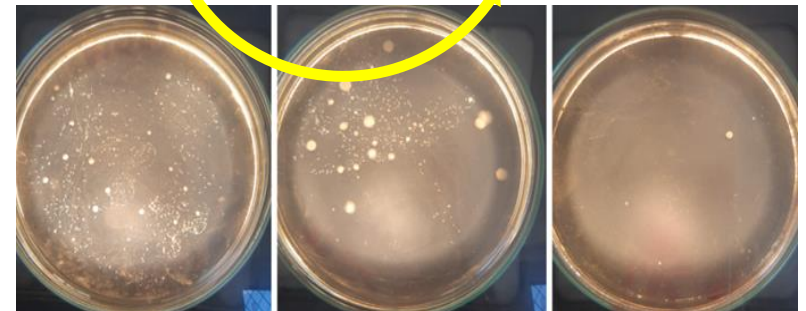
- Desinfección
- Cámaras húmedas

- 300 ml células sobrenadantes
- Inoculación cada 15 días

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

Dinámica Poblacional

- Toma de datos
- Muestras de tierra
- Siembra



Variables a medir

Porcentaje de germinación



Peso fresco



Altura de la planta



Peso seco



Contenido de clorofila



Longitud de raíz



Porcentaje de humedad

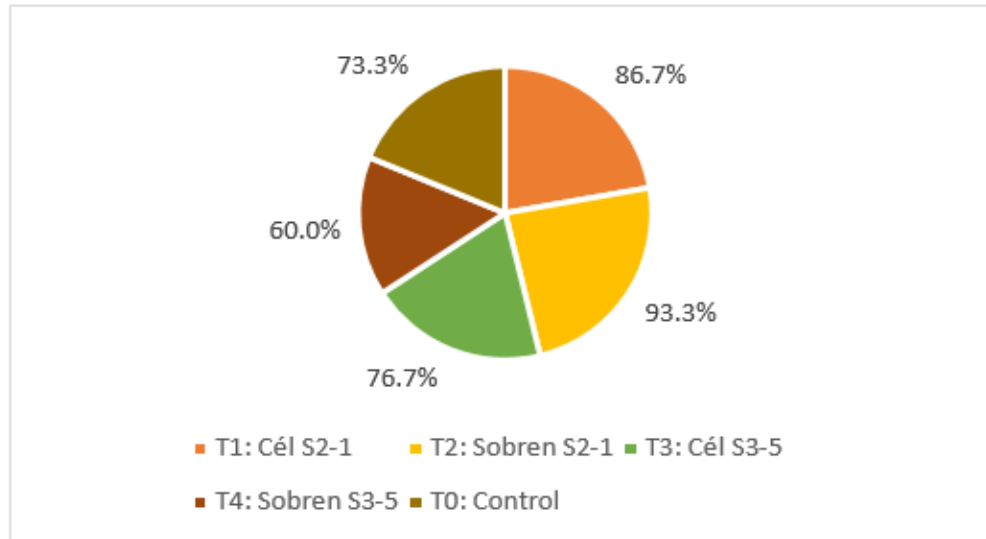


Colonización de raíz



Porcentaje de germinación

Figura 8. Porcentaje de germinación de semillas de *C. sativa*



Nota: Gráfico de autoría

El porcentaje de germinación más alto se presentó en el T2 (sobrenadante de *B. subtilis* S2-1), mientras que el menor porcentaje de germinación se presentó en el T4 (sobrenadante de *B. subtilis* S3-5) y en el T0 (control).

(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 en trigo, lo que concuerda con la posibilidad de que el efecto inhibitor de la inoculación bacteriana sobre la germinación de las semillas es consecuencia del IAA producido por la bacteria.

Altura de plantas

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

No existe 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



Altura de plantas

Tabla 4. Análisis de varianza para la altura de plantas de cañamo

		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	0.0525	s	0.0169	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.

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*



Contenido 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

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.



RESULTADOS

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 (Células o Sobrenadantes S2-1, Células o Sobrenadantes S3-5)	C1	1	0.5040	ns	0.3289	ns	0.0066	ns	0.1096	ns	0.0280	ns	0.1954	ns
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 Inóculo Célula	C3	1	<0.0001	s	0.0004	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s	<0.0001	s
Cepa (S2-1; S3-5) x Inóculo (Células - Sobrenadante)	C4	1	0.1344	ns	0.8483	ns	0.0322	ns	0.1446	ns	0.0171	ns	0.0812	ns

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

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.



RESULTADOS

Peso fresco y peso seco

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	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.

Para el peso fresco, 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.

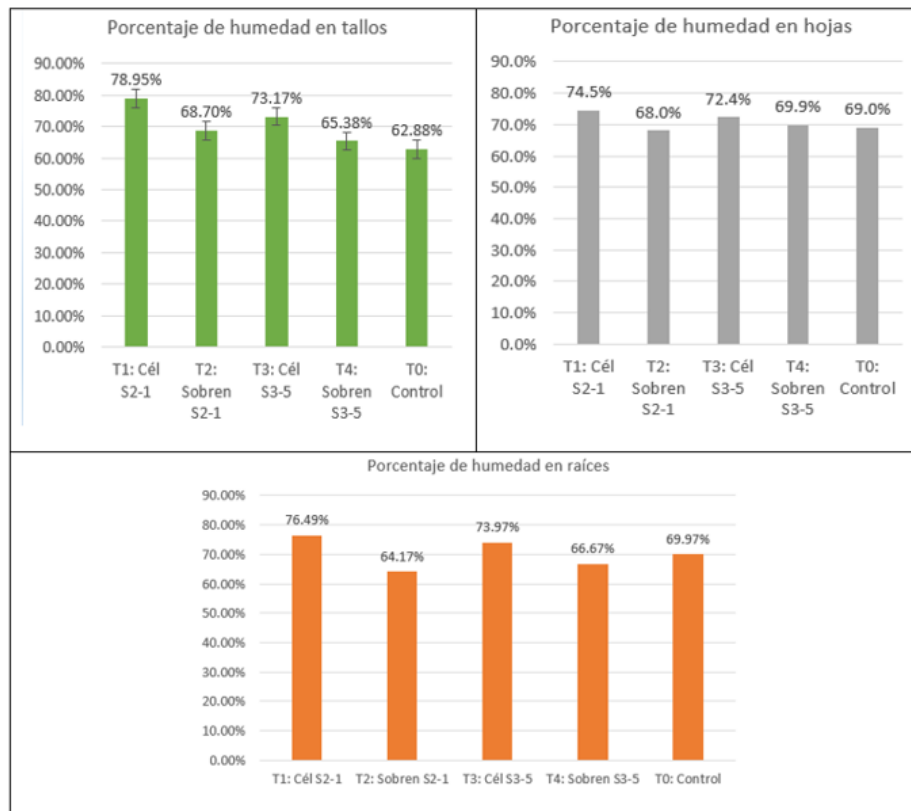
Los valores arrojados demuestran que en los valores de peso seco, en el caso de los tallos que el mejor tratamiento son las células de la cepa S2-1 con 12.38 g, en lo que respecta al peso seco de raíz y hojas, no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, pero en ambos casos los valores más altos corresponden al tratamiento que fue inoculado con células de *B. subtilis* S3-5.

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.



Porcentaje de Humedad

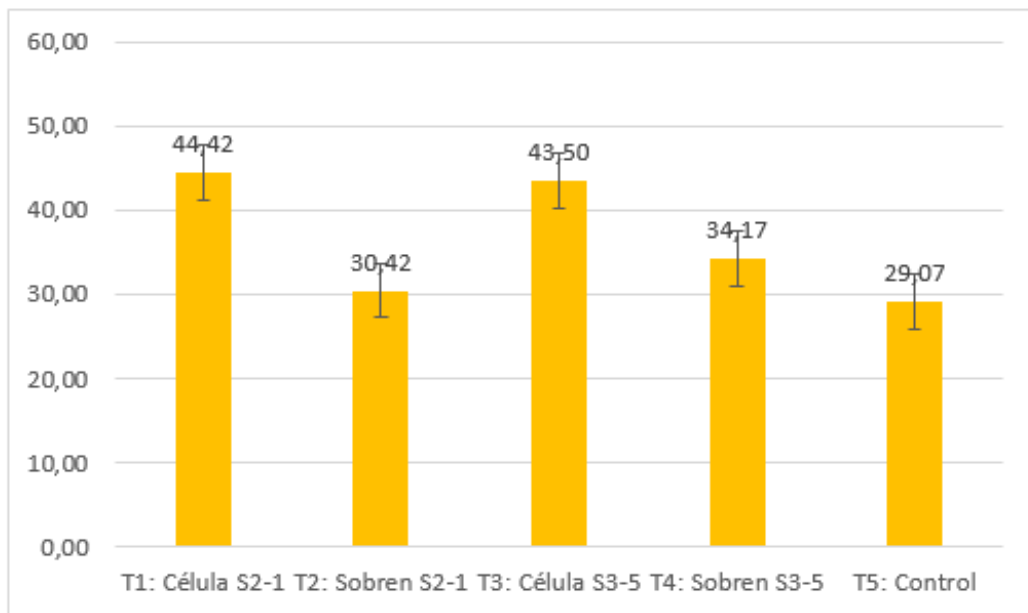
Figura 8. Porcentaje de humedad en tallos, hojas y raíces de *C. sativa*



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



Longitud de raíz



Nota: Gráfico de autoría

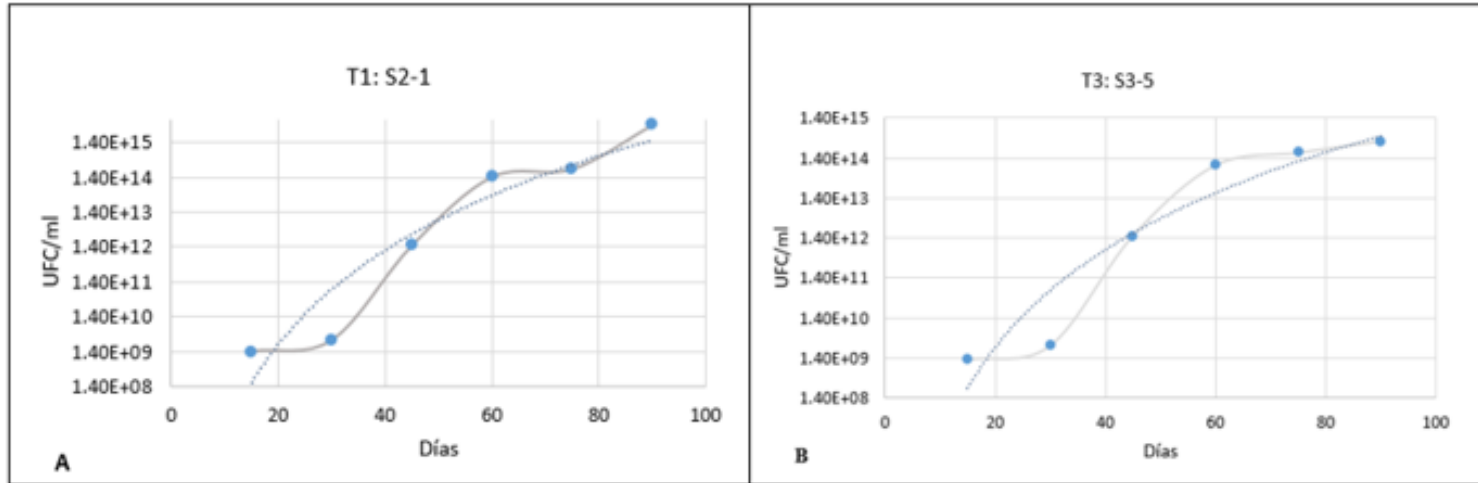
En la longitud de raíz de las plantas de cañamo observamos una pronunciada diferencia significativa entre las raíces que fueron tratadas con las células de las cepas S2-1 y S3-5 y el tratamiento testigo. Los mejores tratamientos fueron T1 y T3 (célula *B. subtilis* S2-1 y S3-5) con valores muy similares.

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.



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



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.



- 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.





Gracias por su atención



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA