

Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Salinas Muñoz, Juana María

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

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

Ing. Falconí Saá, César Eduardo PhD.

01 de septiembre del 2023



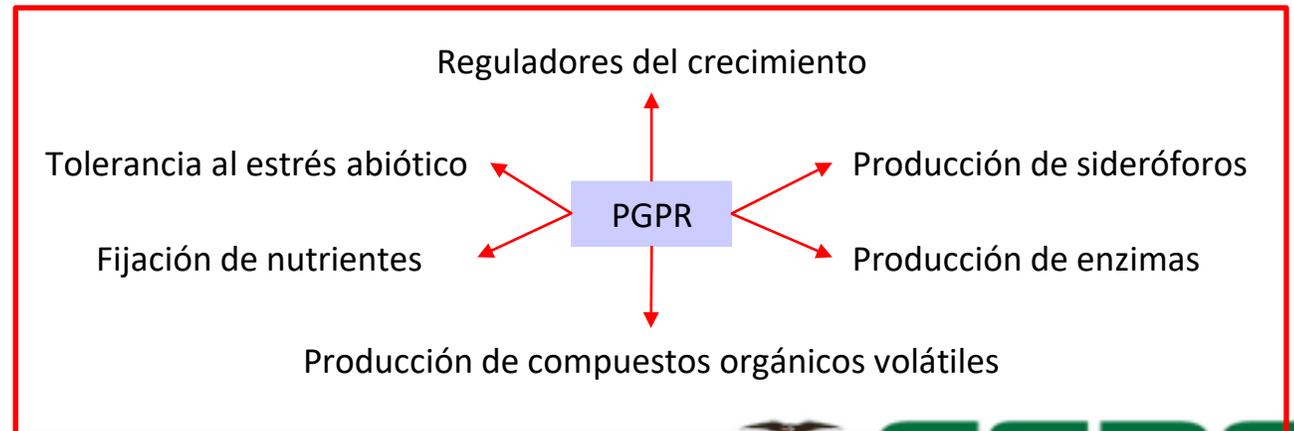
INTRODUCCIÓN

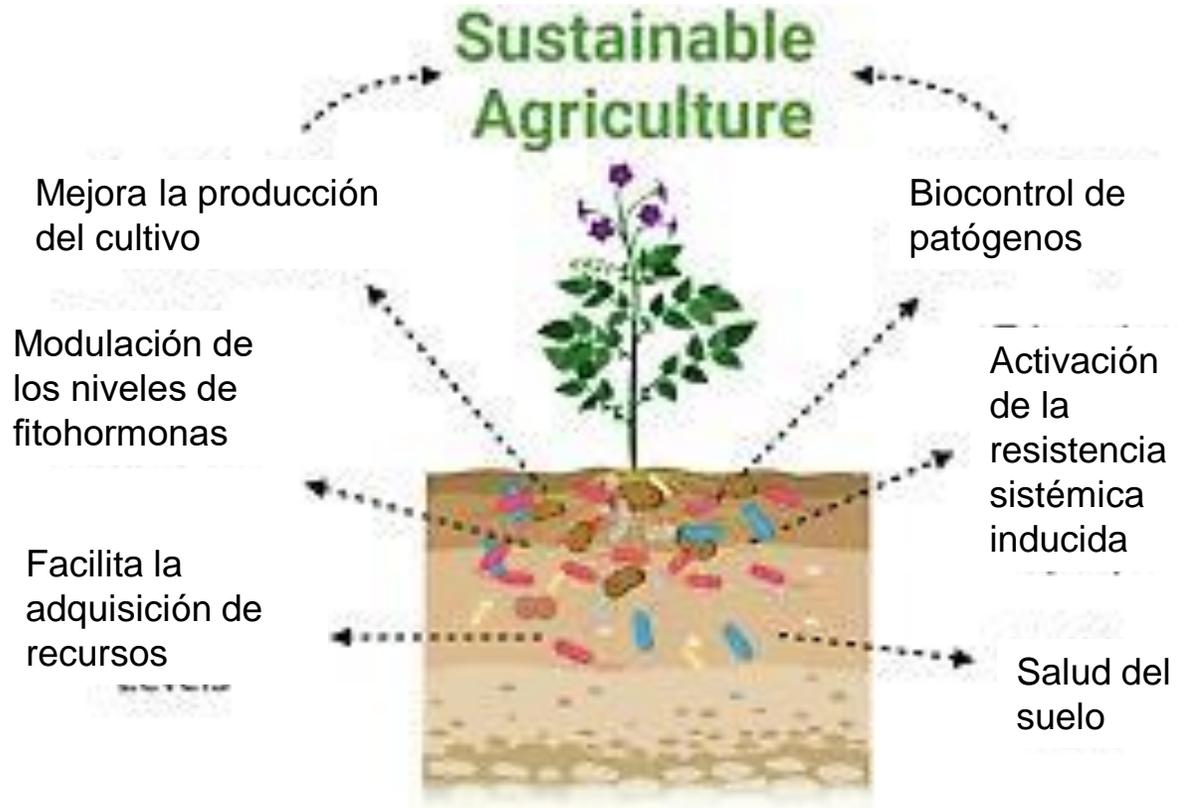


Tomillo es una planta originaria de los países del mediterráneo



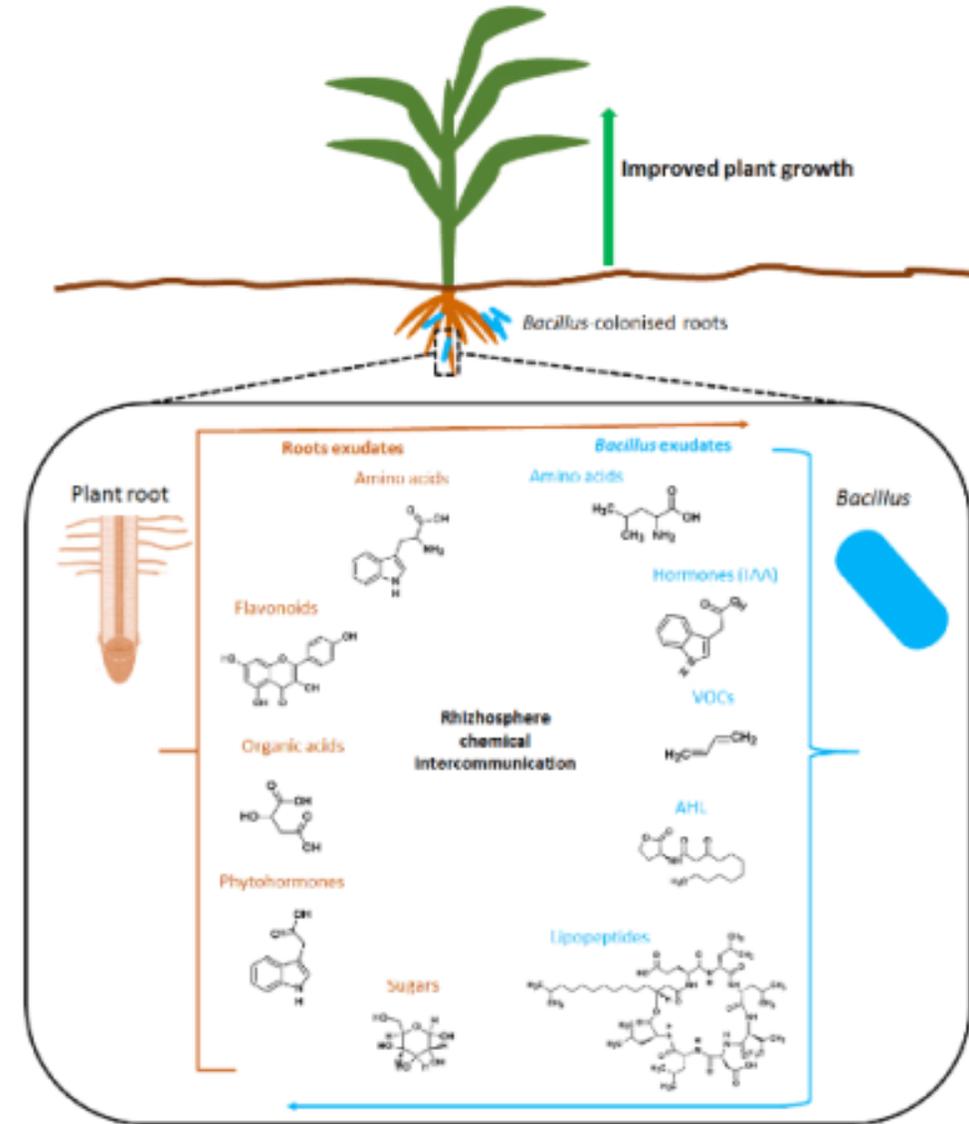
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas





(Hernández-Suárez et al., 2010)

(Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018, 2021, 2022)



Objetivo General

Evaluar el efecto de células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento, producción de auxinas, y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*) en un periodo de 3 meses.

Objetivos específicos

- Analizar la promoción de crecimiento en plantas de tomillo inoculadas con *B. subtilis* en un periodo de 3 meses.
- Determinar la acción enzimática de fitasas y nitrogenasas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5.
- Estimar la acción enzimática de *B. subtilis* en un periodo de 3 meses.
- Cuantificar la dinámica poblacional en la rizosfera de plantas de tomillo cada 15 días en un periodo de 3 meses.

Hipótesis

- **H0:** Las células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no promueven parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomillo.
- **H1:** Las células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promueven parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomillo.

MARCO TEÓRICO

TOMILLO



Thymus vulgaris

Lamiaceae

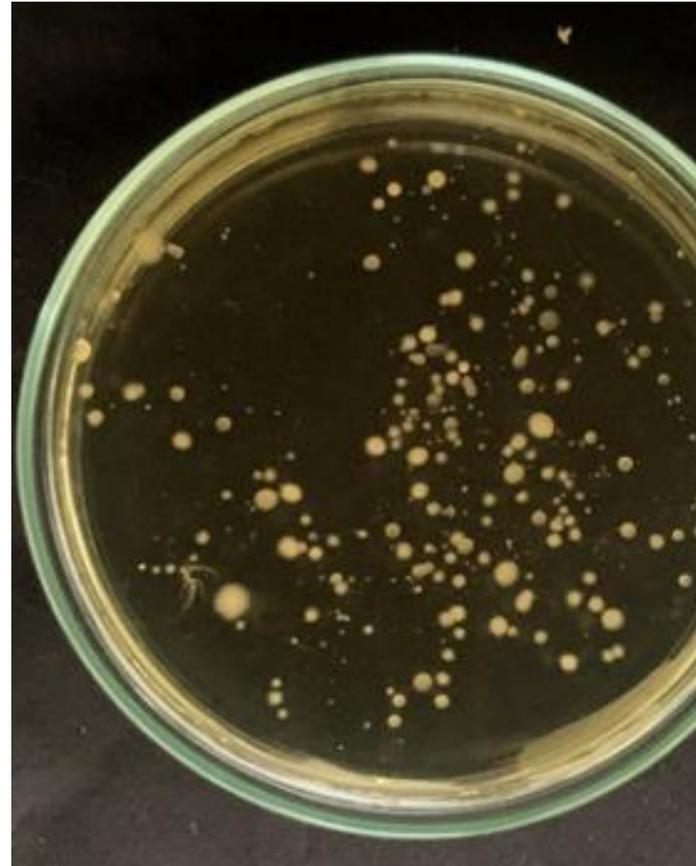
Fenol - Timol - carvacrol

Flavonoides: luteolina-
apigenina

Actividad antiinflamatoria,
antioxidante

Actividad antimicrobiana

B. subtilis



Distribución : suelo, aire,
agua

Color: cremoso amarillento,
mucoide

Forma: circular convexo

Endosporas

Coloniza la raíz

Promotor de crecimiento

Ubicación geográfica



Establecimiento del cultivo



Fibra de coco → 75%
Pomina → 20%
Tierra negra → 5%

Transplante → 6ta semana

Riego por goteo → 2,1 l/hora
Tiempo → 3 min/ 2 veces
Riego / semana → 2

Inoculación de *Bacillus*



SO: Verter el contenido del empaque en un cubo con agua, mezclar el volumen deseado. Aplicar en aspersión o en drench. Aplicaciones semanales en ornamentales y semillas.

Planta	Enfermedad	Dosis/Aplicación
Fruta de hueso Cacao	Monilia: <i>Monilinia spp./Moniliophthora roreri</i>	1,5-2 L/ha
Ornamentales herbáceos aromáticos y medicinales	Botritis y oidio: <i>Botrytis cinerea/Podosphaera fusca</i>	3-5 ml/L
Tomate y hortalizas	Moho gris y bacteriosis: <i>Botrytis cinerea/Pseudomonas syringae</i>	2-4 L/ha
Gramíneas (arroz) y leguminosas (choccho)	Anubio de la vaina y antracnosis: <i>Rhizoctonia solani/Colletotrichum spp.</i>	2-4 L/ha

PRECAUCIONES: El mal uso puede causar daños a la salud animal, humana y el ambiente. No contaminar aspersiones cerca de reservorios. Conservar el producto en el envase original. Evitar el uso de recipientes absorbentes desechables y eliminar acorde a regulaciones locales. Mantener los recipientes limpios para la aplicación.



Ornamentales: 4ml/L

Inoculación: 50 ml (parte basal de cada planta)

Diseño experimental

Tratamientos:

T0: testigo

T1: inoculación con *B. subtilis* CtpxS2-1

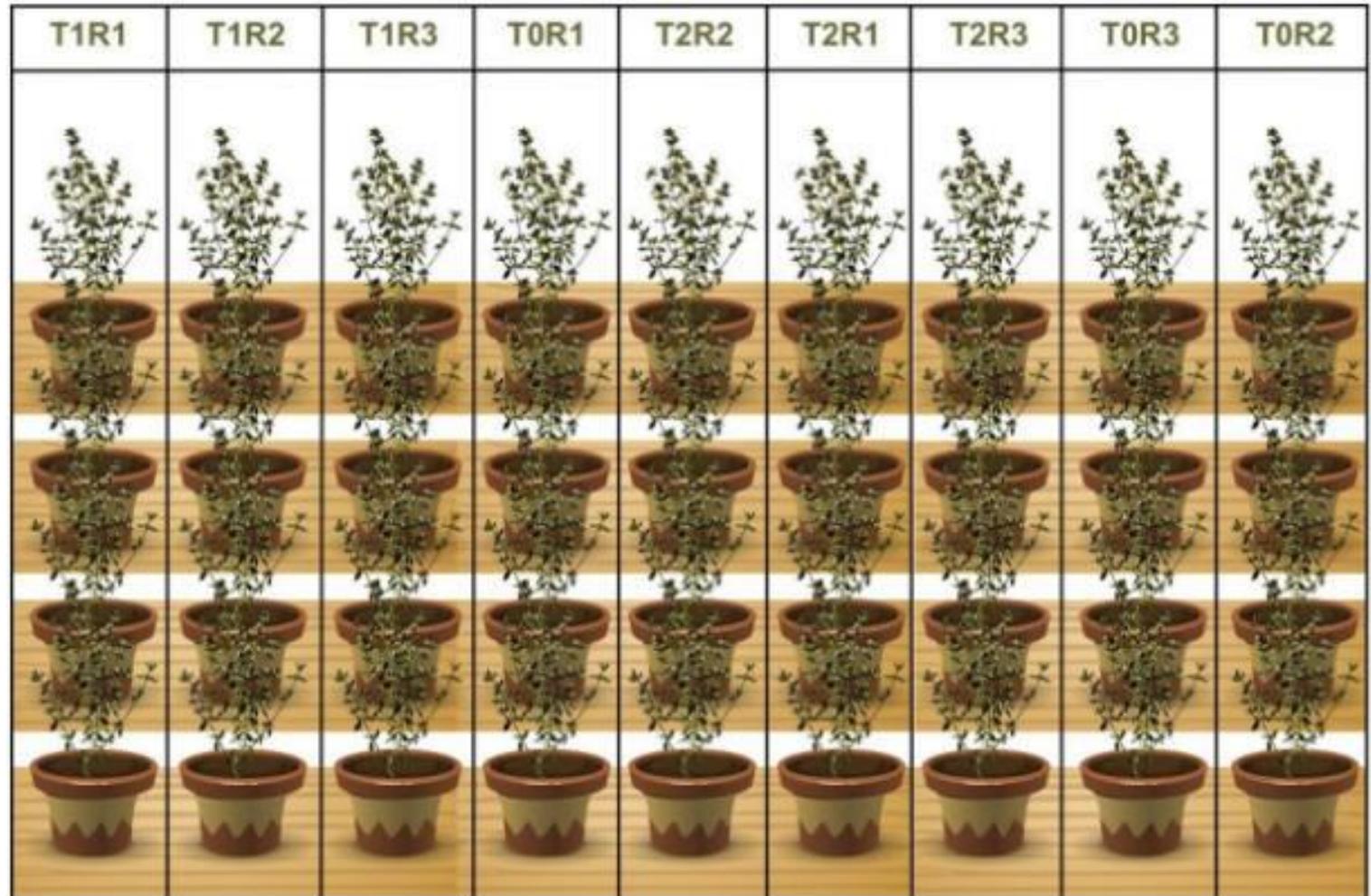
T2: inoculación con *B. subtilis* CtpxS3-5

Diseño:

Diseño completamente al azar (DCA)

Análisis de varianza ANOVA

Método de comparación Tukey 5%



Croquis experimental

VARIABLES A MEDIR

Altura de planta



Base - tallo más largo

Datos de altura: 5 (3 meses)



Dinámica poblacional



Toma de muestras (rizosfera)



Medio NYDA



Dilución



Plateo



Incubación

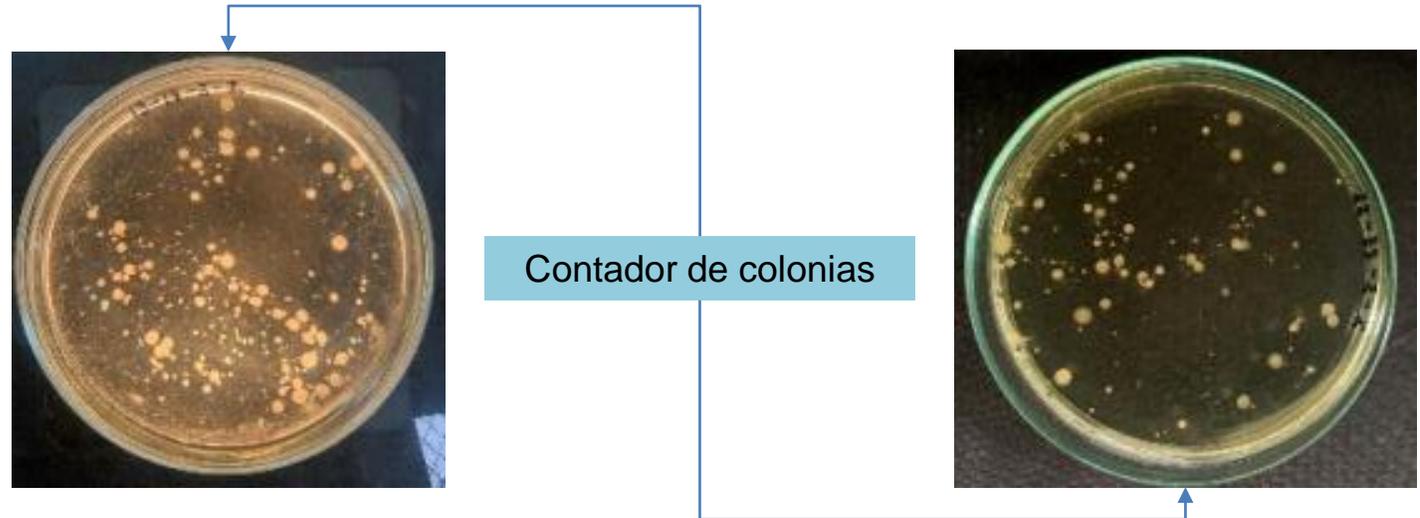
Dinámica poblacional

Criterios para conteo

Lógicos (elegir las cajas que contengan un rango 25 a 250 colonias)

Estadísticos (cuando existan más de 250 colonias se realiza conteos por duplicado y se considera el mayor número posible de datos)

Funcionales (a falta de datos representativos, tomar los mejores disponibles)

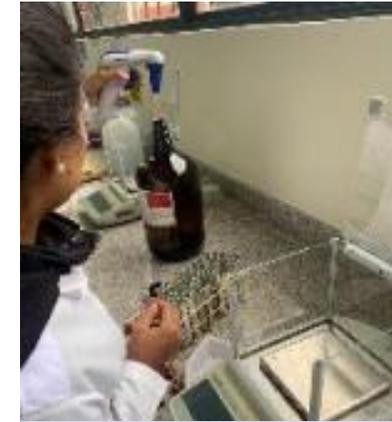


$$UFC/g = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrados en ml}}$$

Clorofila



Pesaje



Etanol (96%)



Vortex



Centrifugación



Sobrenadante



Lectura

$$\text{Clorofila } a = (13,36 * \text{Absorbancia } 663) - (5,19 * \text{Absorbancia } 645)$$

$$\text{Clorofila } b = (27,43 * \text{Absorbancia } 645) - (8,12 * \text{Absorbancia } 663)$$

Peso fresco y peso seco

80 días a partir del transplante

96°C/ 24 horas



Auxinas

Elaboración de reactivo Salkowsky



Curva de calibración



Solución madre (uL)	Agua destilada (uL)
0	1000
5	995
10	990
15	985
20	980
25	975
30	970

$R^2=0,99$



Carga de muestras



Acción enzimática



Solubilización de fósforo

Dispensado y siembra de colonias bacterianas en los medios



2 días

← Incubación →

5 días

Fijación de nitrógeno



DINÁMICA POBLACIONAL

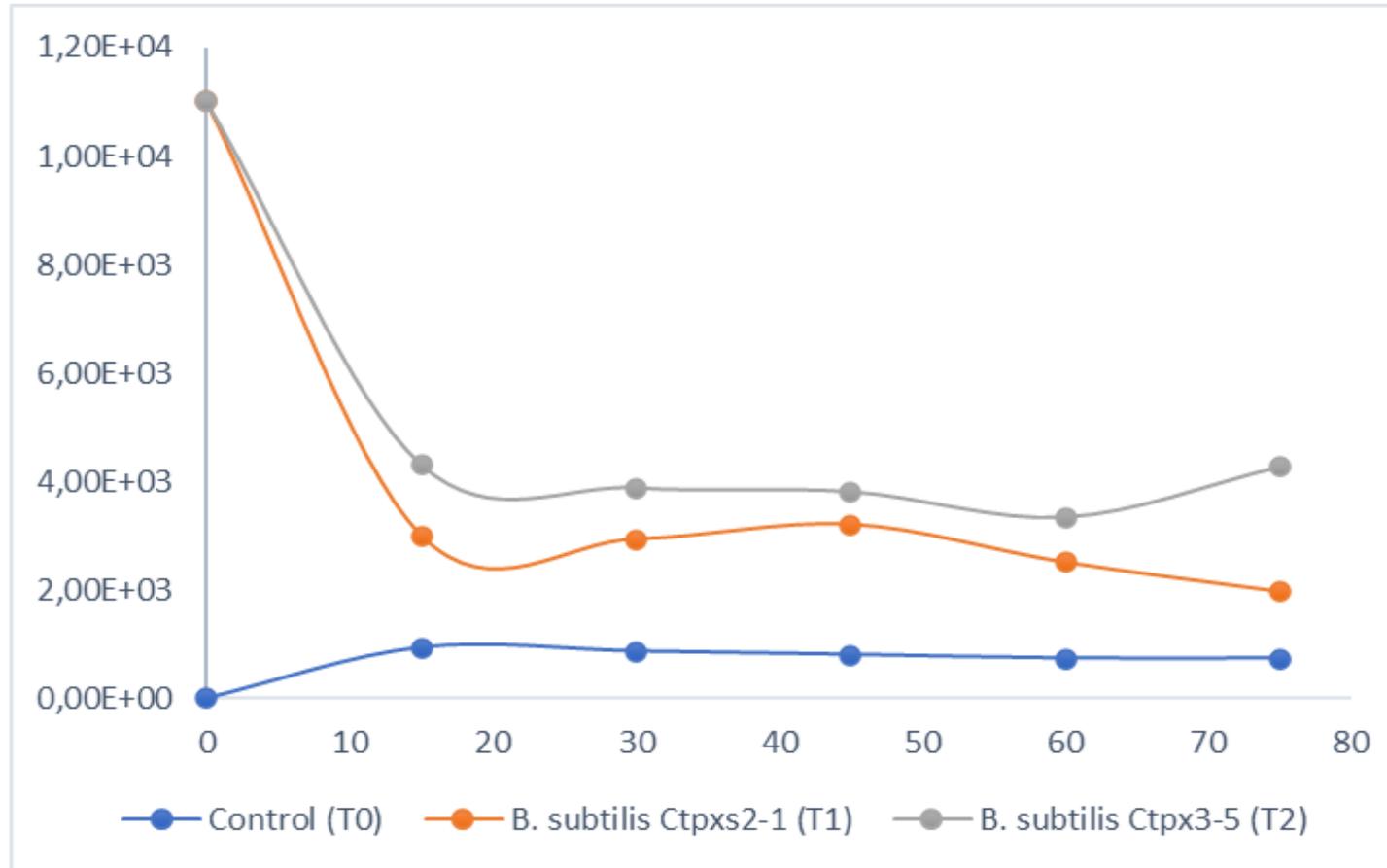
Figura 2. Dinámica poblacional de la rizosfera de tomillo (*T. vulgaris*) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días del trasplante

Población día 15

Testigo: 9,3E+02 UFC/g
CtpxS2-1: 3,0E+03 UFC/g
CtpxS3-5: 4,3E+03 UFC/g

Población día 75

Testigo: 7,33E+02 UFC/g
CtpxS2-1: 1,96E+03 UFC/g
CtpxS3-5: 4,26E+03 UFC/g



La colonización bacteriana de las raíces de las plantas es un paso crucial en la interacción entre el microbio y la planta (Blake *et al.* 2021)

Así como las distintas cepas de *B. subtilis* varían en su capacidad para promover el crecimiento de las plantas y controlar los fitopatógenos, también varían en su capacidad para colonizar con éxito las raíces de las plantas (Blake *et al.* 2021).



ALTURA DE PLANTA

Tabla 1. *Altura de plantas de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 75 días del trasplante.*

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.				
Testigo	8,83 ± 1,51 a	10,83 ± 1,66 a	12,17 ± 1,44 a	13,43 ± 1,29 a	14,88 ± 1,84 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1	9,75 ± 0,25 a	11,67 ± 0,14 a	12,83 ± 0,29 a	13,63 ± 0,38 a	15,77 ± 0,77 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5	10,50 ± 1,32 a	12,00 ± 0,25 a	12,86 ± 0,65 a	13,88 ± 0,22 a	16,75 ± 2,22 a

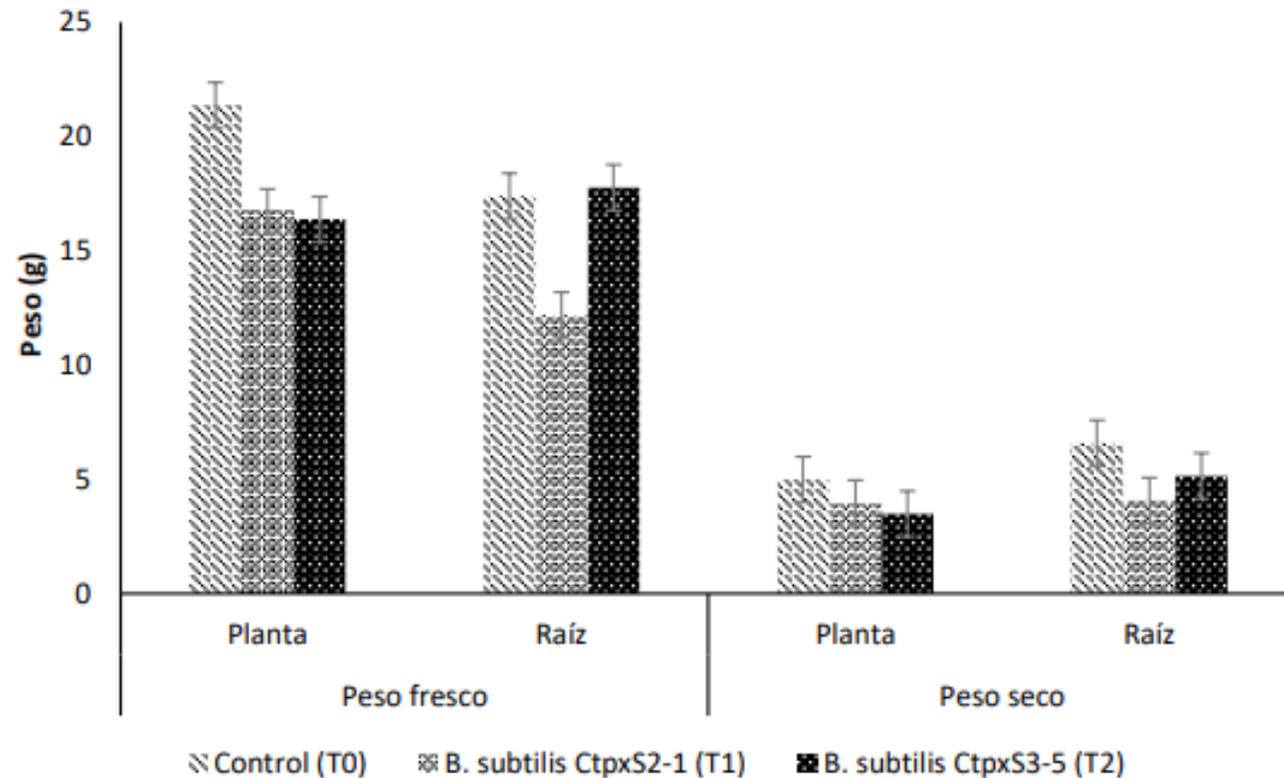
Nota. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, ($p > 0,05$).
Media ± desviación estándar. Autoría propia.

Blake et al. (2021) *B. subtilis* actúa sobre el crecimiento vegetal mediante mecanismos directos e indirectos, mejorando la disponibilidad de nutrientes, cambiando el equilibrio de la hormona de crecimiento de plantas, entre otros.

Morato (2010) obtuvo alturas con medias de 17,51 cm y 18,94 cm para diferentes dosis de materia orgánica (20 y 40 t/Ha), aplicadas en plantas tomillo.

PESO FRESCO Y SECO

Figura 2. Peso fresco y seco de plantas y raíces de tomillo (*T. vulgaris*) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días del trasplante



Hashem et al. (2019) y **Corrales Ramírez et al. (2012)**, mencionan que, los beneficios de las PGPR se han determinado mediante su efecto sobre las raíces y crecimiento de la planta, una vez la bacteria a colonizado la rizosfera.

Gutiérrez et al. (2022), obtuvieron resultado favorables para *B. subtilis* sobre el peso fresco de las raíces de *Z. mays*.

ÍNDICE DE CONTENIDO DE CLOROFILA

Tabla 2. Contenido de clorofila de plantas de tomillo (*T. vulgaris*) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días del trasplante

Tratamiento	Día 15	Día 70
	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Tratamiento	19,95 ± 2,23 a	25,95 ± 1,45 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1	16,82 ± 1,93 a	25,95 ± 1,18 a
<i>B. Subtilis</i> CtpxS3-5	24,66 ± 0,47 a	26,14 ± 0,61 a

Nota. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, ($p > 0,05$). Media ± desviación estándar. Autoría propia.

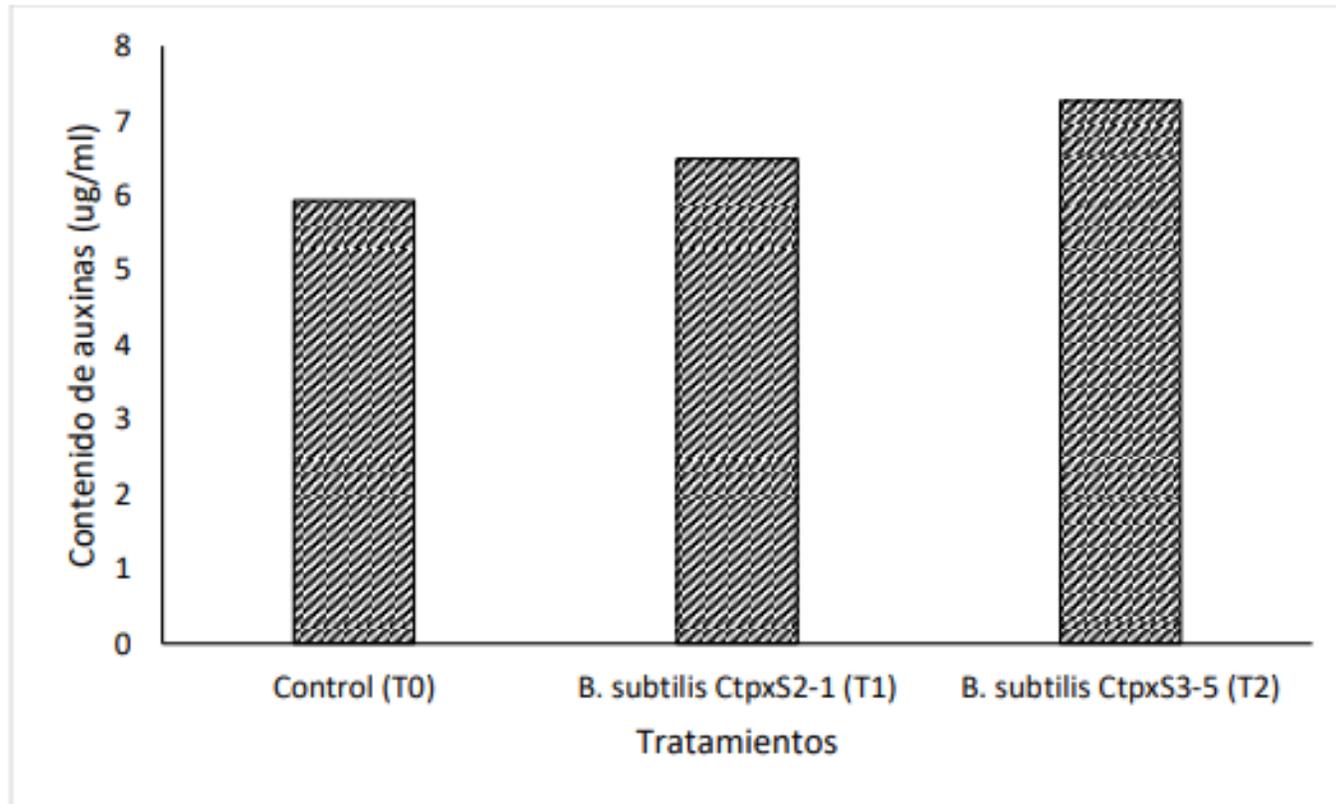
Sikorska-Zimny (2021) se mostraron resultados favorables en cuanto al contenido de clorofila encontrados en tejido vegetales de plantas de tomillo cultivadas de manera orgánica en relación al testigo (18,75 mg/ml).

El contenido de clorofila está, determinada por la facilidad que brinda la bacteria a las plantas de tomillo para fijar nitrógeno, elemento que asociado con el contenido de clorofila, de igual manera, el estado nutrimental de la planta mejora (**Abreu et al., 2020; Pishchik et al., 2016**).

Mientras mayor sea el contenido de clorofila mayor será la eficiencia fotosintética de la planta, ya que la clorofila se encarga de la conversión de energía luminosa en carbohidratos (sacarosa y almidón) que la planta aprovecha para tener un mayor crecimiento vegetal (**Sikorska-Zimny et al., 2021**).

CONTENIDO DE AUXINAS

Figura 3. Contenido de auxinas en las raíces de tomillo (*T. vulgaris*) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días del trasplante



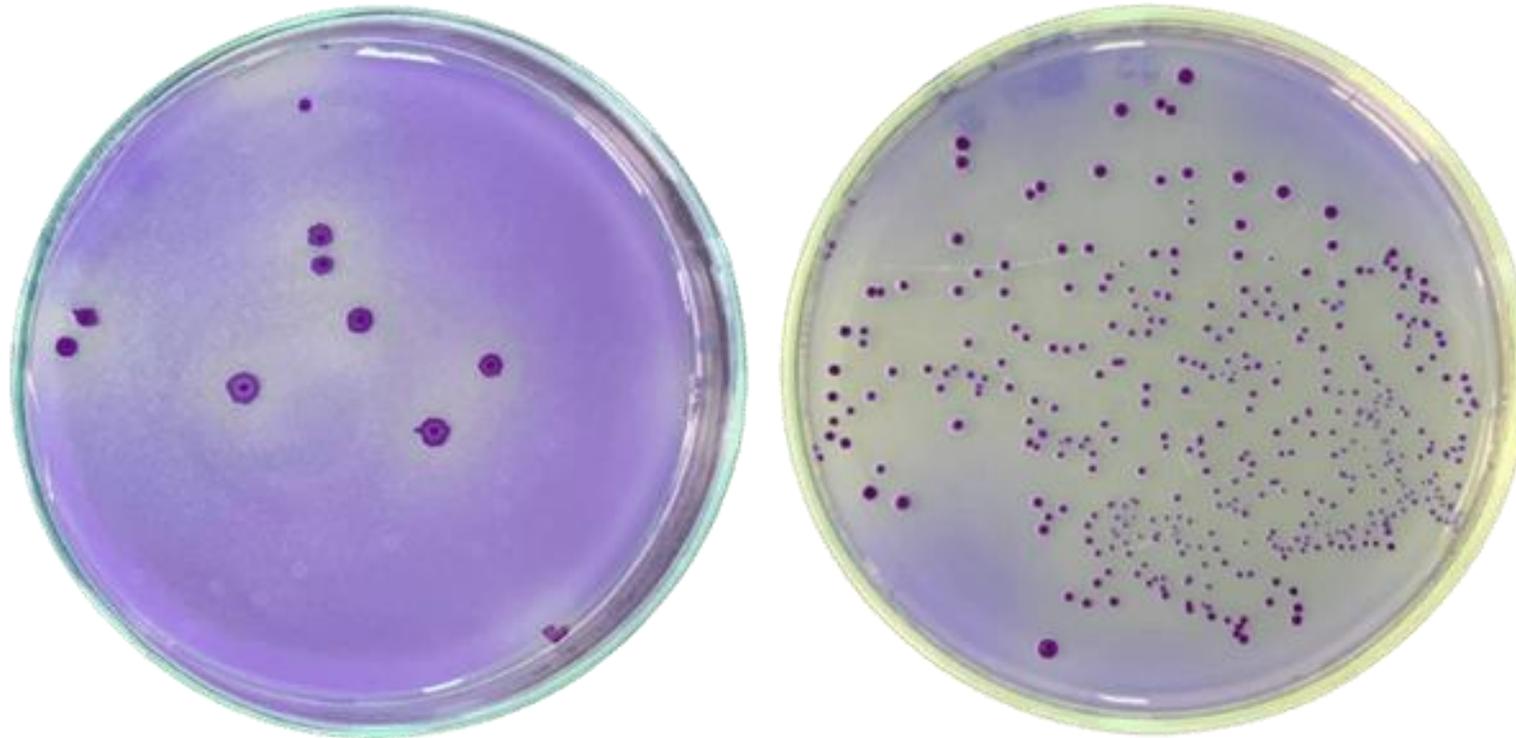
Shen et al. (2023) menciona que *Bacillus* por medio de la síntesis de fitohormonas como las AIA, giberelinas y citoquinas promueven el crecimiento vegetal. Las AIA, son las principales hormonas, mismas que, actúan como promotoras de crecimiento a través de proceso como la elongación celular, desarrollo del área radicular, crecimiento en relación a la nutrición, entre otros.

Blake et al. (2021) señala que, *B. subtilis* regula los niveles de auxinas incrementando su contenido en raíz y disminuyendo en hojas, lo que resulta en un incremento de crecimiento vegetal.

ACCIÓN ENZIMÁTICA FITASAS

García et al. (2015) mencionan que, las cepas *B. subtilis* produce un incremento en el crecimiento en general de la planta debido a su capacidad de solubilizar fosfatos, lo cual se ve reflejado en el contenido de fósforo en los tejidos de las plantas.

Figura 4. Acción enzimática de fitasas



Nota. *B. subtilis* CtpxS2-1 (izquierda), *B. subtilis* CtpxS3-5 (derecha). Autoría propia

ACCIÓN ENZIMÁTICA NITROGENASAS

Figura 5. Acción enzimática de nitrogenasas

Ashby manitol agar, ha demostrado la acción de *Bacillus* en la fijación de nitrógeno, ya que las bacterias toman el manitol contenido en el medio como una fuente de carbono, además de la fijación de nitrógeno atmosférico el cual será la fuente de nitrógeno (**Sigma, nf**).



Nota. Control (izquierda), *B. subtilis* CtpxS2-1 (centro), *B. subtilis* CtpxS3-5 (derecha). Autoría propia



- Las inoculaciones periódicas de dos cepas de *B. subtilis* mostraron un efecto positivo, aunque en menor medida en la promoción de crecimiento vegetal de plantas de tomillo considerando los resultados obtenidos en las variables agronómicas, fisiológicas y microbiológicas, recalcando que inoculaciones con *B. subtilis* CtpxS3-5 numéricamente obtuvieron mejores resultados.
- A pesar de que la cuantificación de *B. subtilis* demostró poblaciones limitadas en la rizosfera de plantas de tomillo, la cepa CtpxS3-5 mantuvo una constante promoción de crecimiento, lo cual se evidencia en la altura (16,75 cm) y biomasa (21,37 g) que alcanzaron las plantas a lo largo de tres meses.
- El contenido de auxinas en plantas de tomillo tratadas con *B. subtilis* mostró una mayor presencia de la fitohormona en plantas inoculadas con la cepa CtpxS3-5, la cual alcanzó 7,26 mg/ml, lo cual influye en la elongación celular promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- La acción enzimática de nitrogenasas y fitasas de *B. subtilis* demostró la capacidad de la bacteria para inducir en la planta la producción de compuestos orgánicos, fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos favoreciendo el crecimiento vegetal y productividad en el cultivo.
- Mediante dinámicas poblacionales se cuantificó poblaciones estimadas de *B. subtilis* a los 75 días después del trasplante registrando $4,26 \times 10^3$ UFC/g, $1,96 \times 10^3$ UFC/g y $7,33 \times 10^2$ UFC/g para las cepas CtpxS3-5, CtpxS2-1 y testigo respectivamente, lo que muestra la dificultad de la bacteria para adaptarse y permanecer viable en la rizosfera de plantas de tomillo, presentando colonizaciones limitadas.

- Prolongar el periodo experimental para garantizar que la adaptación y crecimiento de la bacteria arroje resultados mucho más confiables.
- Realizar un seguimiento de la dinámica poblacional posteriores a los 75 días de la fase experimental para corroborar el comportamiento de la batería en el cultivo.
- Evaluar el contenido de nitrógeno y fósforo en las plantas tratadas para garantizar la acción enzimática de nitrogenasas y fitasas sobre la planta.
- Probar diferentes microorganismos de las PGRP sobre la acción que puedan tener estos con las plantas de tomillo.

AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



César Eduardo Falconí Saá., Phd.

Ing. Darwin Claudio

Familia

Amigos