



Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en etapa juvenil

Loor Castillo, Diego Andrés

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

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

Ing. Cesar E. Falconí Saá, Ph.D

10 de agosto del 2022



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: "Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en etapa juvenil" fue realizado por el señor Llor Castillo, Diego Andrés; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de agosto del 2022



Firmado digitalmente por:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

.....
Ing. Falconí Saá, Cesar Eduardo PhD.
C. C.: 06015564594



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Loor Castillo, Diego Andrés**, con cédula de ciudadanía N° 1726611112, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en etapa juvenil**” 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, 10 de agosto del 2022

Loor Castillo, Diego Andrés

C.C.: 1726611112



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, **Loor Castillo, Diego Andrés**, con cédula de ciudadanía N° 1726611112, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en etapa juvenil**” en el Repositorio Institucional, contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 10 de agosto del 2022

.....
Loor Castillo, Diego Andrés

C.C.: 1726611112

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

Loor Diego_Final_CFS.docx

Scanned on: 2:53 August 12, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	129
Words with Minor Changes	35
Paraphrased Words	124
Omitted Words	1259



FORMA AUTENTICADA POR
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

Ing. Falconi Saá, Cesar Eduardo PhD.
C. C.: 06015564594

Dedicatoria

A mis padres Mauro y Esther por ser mi soporte y compañía durante todo mi proceso de formación hasta este punto, ya que sin ellos no lo habría logrado nada. Por su amor incondicional y guiarme por el buen camino.

A mis hermanos Jairo y Verónica por darme apoyo, consejos y ayudarme a levantarme en momentos en el que sentía que ya no lo iba a lograr durante toda la carrera de estudios. De igual manera por todo su amor.

A mi tío Luis Alfredo por haber sido como otro padre para mí, una de las personas que he llegado a admirar bastante, en paz descanse.

A mi sobrina Ana Paula por regalarme una raya más de felicidad a mi ser.

A mi tía María y primos Jean y Andrea por estar ahí a mi lado dándome apoyo, momentos de felicidad y distracción cuando lo he llegado a necesitar.

Agradecimientos

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I por todos los conocimientos aportados para mi formación profesional, a los docentes que han demostrado su profesionalismo y calidad humana, que me han impartido su conocimientos a lo largo de estos años de carrera universitaria.

A mi Tutor Dr. Cesar Falconí quien propuso el tema de investigación, gracias por sus consejos, apoyo y paciencia que me ha tenido a lo largo del desarrollo de este trabajo. Al Ing. Claudio Darwin de igual manera por su apoyo durante la realización de esta investigación durante la fase de laboratorio.

A todos mis amigos que he conocido a lo largo de la carrera, en especial a Andrea Sarango, Ligia Romero, Eloary Oyos, Diego Muñoz y Erick Rivera por su apoyo brindando durante este trayecto.

Índice de contenidos

Carátula	1
Certificación	2
Responsabilidad de 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 Índice de tablas	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
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	19
Capítulo II	20
Marco referencial	20
Tomate de árbol	20
<i>Descripción botánica</i>	20
Plagas del tomate de árbol.....	21
<i>Pulgones</i>	21

<i>Gusano trozador</i>	21
<i>Mosca blanca</i>	21
Enfermedades del tomate de árbol.....	21
<i>Oídium</i>	21
<i>Mildiu</i>	22
<i>Rhizoctoniosis</i>	22
<i>Nudo de la raíz</i>	22
<i>Marchitez Bacterial</i>	22
<i>Virus del rizado amarillo del tomate</i>	23
Rizobacterias promotores del crecimiento de las plantas	23
<i>Bacillus</i>	24
<i>Bacillus subtilis</i>	24
Capítulo III	27
Metodología	27
Ubicación del lugar de investigación.....	27
Materiales.....	28
<i>Insumos</i>	28
<i>Medios de cultivo</i>	28
<i>Biológicos</i>	28
<i>Equipos</i>	28
Métodos	28
<i>Cepas de B. subtilis</i>	28
<i>Preparación de inóculo de B. subtilis Ctpx2-1 y Ctpx3-5</i>	29
<i>Control de calidad de B. subtilis crecido en un medio de bajo costo</i>	29
<i>Preparación de células y sobrenadante de B. subtilis</i>	29
<i>Establecimiento de plantas en el invernadero</i>	30
<i>Inoculación de B. subtilis Ctpx 2-1 y Ctpx 3-5 en plantas de tomate de árbol</i> ...	31

	10
VARIABLES A MEDIR	32
<i>Altura de planta y colonización de raíz</i>	32
<i>Dinámica poblacional de Bacillus subtilis</i>	33
<i>Índice de contenido de clorofila</i>	34
<i>Peso fresco y peso seco de raíces, tallos y hojas</i>	35
<i>Área de raíces</i>	36
DISEÑO EXPERIMENTAL	36
<i>Análisis estadístico</i>	36
Capítulo IV	39
Resultados y Discusión	39
Altura de la planta.....	39
Clorofila	41
Área raíz.....	44
Peso fresco y peso seco.....	47
Dinámica poblacional de <i>B. subtilis</i> Ctpx2-1 y Ctpx3-5	50
Colonización de Raíz.....	52
Conclusiones	55
Recomendaciones	55
Bibliografía.....	56

Índice de tablas

Tabla 1 Descripción de los tratamientos	37
Tabla 2 Descripción de los contrastes	38
Tabla 3 Análisis de varianza de altura de plantas por defecto de células o sobrenadantes de <i>B. subtilis</i> durante siete diferentes periodos de inoculación	39
Tabla 4 Análisis de varianza para el índice de Contenido de Clorofila de plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de 7 diferentes periodos de inoculación	42
Tabla 5 Análisis de varianza para el área de raíz de plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de 7 diferentes periodos de inoculación	45

Índice de figuras

Figura 1 Visión satelital del área de estudio	27
Figura 2 Instalación de los rizotrones en el lugar de estudio	30
Figura 3 Trasplante de las plantas de tomate de árbol (2 meses de edad) a los rizotrones.....	31
Figura 4 Medición de la altura de las plantas de tomate de árbol	33
Figura 5 Procedimiento para la dinámica poblacional de <i>B. subtilis</i>	34
Figura 6 Peso fresco y seco de hojas, tallos y raíces	35
Figura 7 Medición del área radicular con ayuda del software DIRT	36
Figura 8 Croquis experimental del ensayo en campo	37
Figura 9 Altura de plantas de tomate de árbol por cada inoculación realizada por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de siete periodos de inoculación	40
Figura 10 Variación de la altura de las plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de 105 días	41
Figura 11 Índice del Contenido de Clorofila de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de siete inoculaciones	43
Figura 12 Variación del Índice de Contenido de Clorofila de plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> inoculadas a lo largo de 105 días.....	44
Figura 13 Área de raíz de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadante de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de siete inoculaciones.....	46
Figura 14 Variación del área de raíz de plantas de árbol por efecto de células o sobrenadante de dos cepas de <i>B. subtilis</i> inoculadas a lo largo de 105 días	47

Figura 15 Peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad de las de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de siete inoculaciones	48
Figura 16 Peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad del tallo de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de siete inoculaciones	49
Figura 17 Peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad de la raíz de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadantes de dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de siete inoculaciones	50
Figura 18 Dinámica poblacional de células y sobrenadantes de <i>B. subtilis</i> Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en la rizosfera de plantas de tomate de árbol a lo largo de siete inoculaciones	51
Figura 19 Nivel de absorbancia para los sobrenadantes de las cepas de <i>B. subtilis</i> Ctpx2-1 y Ctpx3-5 a lo largo de siete periodos de inoculación	52
Figura 20 Colonización de la rizosfera de plantas de tomate de árbol de las cepas de <i>B. subtilis</i> Ctpx2-1 y Ctpx3-5 expresada en Unidades Formadoras de Colonia por milímetro (UFC/ml).....	53

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar dos cepas de *B. subtilis* (Ctpx2-1 y Ctpx3-5) en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en etapa juvenil utilizando células y sobrenadante libre de células de estas bacterias, el estudio tuvo una duración de 105 días y fue realizado en el periodo abril 2022 a julio 2022 en la Hacienda el Prado, ubicada en la provincia de Pichincha – Ecuador. El estudio se dividió en dos fases, el primero fue fase de campo y el segundo fase de laboratorio. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 2 + 1$, para medir las variables de altura de planta, índice de contenido de clorofila, área de raíz, peso húmedo y peso seco de la planta, dinámica poblacional y colonización de la raíz de las bacterias. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y cuando hubo diferencias significativas las medias se discriminaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). En la mayoría de las variables estudiadas se tuvo que tanto células como sobrenadante de *B. subtilis* mostraron diferencias significativas comparado con el tratamiento control. En conclusión, bajo el manejo de inoculación de dos cepas de *B. subtilis* (Ctpx 2-1 y Ctpx 3-5) se demostró tener un efecto favorable en la promoción de crecimiento del tomate de árbol en etapa juvenil, siendo la cepa Ctpx 2-1 la que más destacó positivamente en las variables estudiadas.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, células, sobrenadante, dinámica poblacional, promoción de crecimiento vegetal, tomate de árbol

Abstract

The objective of this study was to evaluate two strains of *B. subtilis* (Ctpx2-1 and Ctpx3-5) in the growth promotion of tomato tree (*Solanum betaceum*) in juvenile stage using cells and cell-free supernatant of these bacteria, the study had a duration of 105 days and was conducted in the period April 2022 to July 2022 at Hacienda el Prado, located in the province of Pichincha - Ecuador. The study was divided into two phases, the first was a field phase and the second was a laboratory phase. A completely randomized design with a 2 x 2 + 1 factorial arrangement was used to measure the variables of plant height, chlorophyll content index, root area, wet weight and dry weight of the plant, population dynamics and root colonization of bacteria. The data were subjected to analysis of variance and when there were significant differences the means were discriminated by Tukey's test ($p < 0.05$). In most of the variables studied, both cells and supernatant of *B. subtilis* showed significant differences compared to the control treatment. In conclusion, under the inoculation management of two strains of *B. subtilis* (Ctpx2-1 and Ctpx3-5) it was shown to have a favorable effect on the promotion of tomato tree growth in the juvenile stage, with the Ctpx2-1 strain being the one that stood out most positively in the variables studied.

Key words: *Bacillus subtilis*, cells, supernatant, population dynamics, vegetal growth promotion, tomato tree

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) se considera una planta originaria de América del sur, se estima que el país de origen es entre el noroeste de Argentina y sur de Bolivia. El centro de domesticación de esta planta está considerado entre Perú y Ecuador (Díaz et al., 2017), es cultivada en altitudes que van alrededor de los 2000 a 2800 msnm con temperaturas que oscilan entre los 13 a 24°C (Feicán et al., 2016). En el caso de Ecuador las zonas de producción son las provincias de la sierra y Napo en la Amazonía, siendo las provincias de Imbabura, Tungurahua y Pichincha las de mayor producción (Díaz et al., 2017), las zonas de mayor área cultivada en el caso de las provincias de la sierra están entre los 2000 a 2500 msnm y las provincias orientales entre los 100 a 1500 msnm (Feicán et al., 2016). En el año 2020 tenía una superficie sembrada de 3779 hectáreas, con una producción anual aproximada de 70 toneladas de fruto fresco (MAGAP, 2016).

El tomate tiene un sistema radicular que puede alcanzar profundidades de hasta un metro, pero la interacción entre microorganismos y las raicillas, complejo conocido como rizosfera, se encuentra a los 50 cm de profundidad (León et al., 2004).

Ciertos microorganismos que actúan en la rizósfera, tienen efectos benéficos sobre las raíces y el crecimiento general de las plantas, a este conjunto se los conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas denominadas PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Hashem et al., 2019).

Las PGPR son consideradas como una alternativa sostenible para la agricultura, mejoran la producción de los cultivos, en pre y post cosecha y reducen el impacto ambiental a causa del uso excesivo de químicos (Cerozi & Fitzsimmons, 2016). El mecanismo de acción de dichas bacterias es muy diverso por lo que son divididos en mecanismos directos e indirectos.

En el caso del primero se refiere a que ocurre dentro de la planta mientras que el segundo es lo que ocurre fuera de la planta.

Bacterias del género *Bacillus* sp, pertenecen al conjunto de PGPR, el mecanismo de acción de la bacteria, es a través de compuestos exudados, que estimulan el crecimiento y reducen el estrés de las plantas (Hashem et al., 2019), también, tiene efecto anti fúngico y antibiótico que mejora la salud del cultivo (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018).

Justificación

En la actualidad el reemplazo al uso de agroquímicos para obtener una buena producción es de singular importancia debido a los múltiples problemas que causa los productos sintéticos fitosanitarios tales como contaminación del medio ambiente y, resistencia de los patógenos. Los suelos desgastados por las actividades realizadas por el ser humano van en aumento por lo cual se reduce los espacios cultivables, se incrementa la erosión del suelo con lo cual también llega a afectar a la salud humana (Benjumeda, 2017).

Una forma de control biológico es mediante el uso de microorganismos el cual se considera una estrategia eficiente para el control de enfermedades ya que el patógeno tiene mínima posibilidad de desarrollar resistencia, pero adicionalmente los microorganismos son considerados promotores de crecimiento vegetal (González & Fuentes, 2016; Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal han demostrado tener efectividad en mejorar la productividad de las plantaciones ya que estas al colonizar la rizósfera mejoran el desarrollo de las plantas por varios mecanismos, en el caso de mecanismos de acción directa la fijación de nitrógeno, solubilización del fosfato, elaboración de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno); mientras que en el caso de mecanismos de acción indirecta la elaboración de sideróforos, de quitinasa y glucanasa, de antibióticos, de cianuro de hidrógeno y amoníaco (Mishra et al., 2021).

Entre estas bacterias promotoras de crecimiento podemos mencionar al *Bacillus subtilis*, esta es una bacteria gran positiva con características morfológicas que le permiten ser resistente a las condiciones desfavorables en el ambiente, posee propiedades antifúngicas las cuales disminuyen el crecimiento o eliminan a patógenos como *Colletotrichum acutatum* en chocho (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2018), y adicionalmente promueven la síntesis de catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, es decir sustancias precursoras de la resistencia vegetal y así promueven el crecimiento de radículas y plúmulas en semilla pre-inoculada (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021). En este estudio el efecto de dos aislamientos de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecidos en un medio de bajo costo (Yáñez-Mendizábal et al., 2011) será investigado en la promoción de crecimiento del tomate de árbol durante 3 meses a partir de la fase juvenil que comienza a los 2 meses de edad.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* en el crecimiento de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), bajo condiciones de invernadero durante la etapa juvenil

Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en un medio de bajo costo en un periodo de 3 meses.
- Cuantificar la colonización de dos cepas de *B. subtilis* en la rizósfera de tomate de árbol cada 15 días durante 3 meses.
- Monitorear el efecto de células y sobrenadantes de *B. subtilis* sobre parámetros agronómicos de plantas de tomate de árbol de 2 meses de edad durante un periodo de 3 meses.

Hipótesis

Ho: Células o sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 crecidos en medio de bajo costo no afectan el crecimiento de plantas de tomate de árbol.

H1: Células o sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 crecidos en medio de bajo costo afectan el crecimiento de plantas de tomate de árbol.

Capítulo II

Marco referencial

Tomate de árbol

Descripción botánica

Taxonómicamente el tomate corresponde a la familia solanáceas y su nombre científico (*Solanum betaceum*) fue postulado por primera vez por el español botánico Cavanilles. La plantación de tomate suele alcanzar alturas alrededor de dos a cuatro metros, se lo considera de rápido crecimiento con raíces pocas profundas que llegan a crecer alrededor de 100 a 150 cm (Ramírez & Kallarackal, 2019).

El desarrollo de la planta a partir del tallo principal se ramifica en 3 ramas primarias, de estos en el tercer o cuarto nudo se da la inflorescencia. Las hojas pueden alcanzar entre 30 a 40 centímetros de largo y entre 20 a 35 centímetros de ancho, el peciolo es largo, la hoja es de forma acorazonada y el ápice puntiagudo. Para un desarrollo reproductivo y vegetativo óptimo se debe tomar en cuenta las temperaturas diurnas y nocturnas, para el primero se debe tener temperaturas de entre 25 a 30 °C y el segundo entre 16 a 20 °C (Feicán et al., 2016).

Los frutos tienen forma ovalada, el color de la cáscara puede variar de color amarillo, amarillo anaranjado, naranja, rojo oscuro o rojo púrpura. En el caso de la pulpa es de color amarillo cremoso, naranja pálido o rojizo (Ramírez & Kallarackal, 2019).

El tomate de árbol amarillo puntón proviene de la cruce *Solanum unilova* x *Solanum betaceum*, puede llegar a una altura aproximada de 3 metros, el diámetro de tronco puede ser hasta de 6.7 cm y el diámetro de copa puede alcanzar hasta los 2.32 m, a nivel fenológico el inicio de floración se da a partir de los 6 meses y el proceso de cosecha alrededor de los 11 meses. El rendimiento por planta está en torno a 5.7 kg, por tanto, alrededor 14 toneladas por hectárea (2.500 plantas por ha). El peso del fruto puede variar entre 65 a 70 gramos, tienen una largueza de 6.8 cm y una anchura de 4.5 cm (Viera et al., 2002).

Plagas del tomate de árbol

Pulgones

Son insectos que se caracterizan por ser pequeños con una tonalidad que puede ser verde, rojo o negro. Viven en colonias y se las puede encontrar generalmente en el envés de las hojas que estén tiernas o también se las encuentra en las yemas. Estos insectos se alimentan de la savia de la planta, cuando las poblaciones son muy altas las hojas pueden presentar deformaciones o en el peor de los casos la planta llega a morir.

Gusano trozador

Los gusanos trozadores (*Agrotis sp.*) pueden ocasionar daños considerables generalmente a las plantas que son recién trasplantadas o también después de efectuar el control de malezas en épocas de sequía. Las larvas se alimentan de la base del tallo de la planta haciendo que esta pierda estabilidad y termine por caer (Revelo et al., 2008).

Mosca blanca

La mosca blanca se caracteriza por causar daño a la planta tanto en estado de larva como adulto, aunque son insectos muy pequeños si su número de población es alta puede producir ciertas cantidades de melaza en su alimentación el cual queda impregnando sobre las hojas o en los frutos el cual da paso a que se produzca la fumagina el cual se forma cuando crece el hongo *Cladosporium sp.* llegando a causar problemas en el proceso de fotosíntesis de la planta y también los frutos pueden llegar a perder su calidad. Cabe mencionar que la mosca blanca también es conocida por ser el trasmisor del virus del rizado amarillo del tomate (Torres & Florez, 2009).

Enfermedades del tomate de árbol

Oídium

Esta enfermedad es causada por el hongo *Oidium sp* y se caracteriza por presentar manchas blancas polvosas en el peciolo de las hojas exclusivamente en la parte superior o

también en el tallo, conforme va avanzando la enfermedad las manchas se van oscureciendo y las hojas se necrosan con lo cual caen al suelo y únicamente se pueda observar el follaje en la parte superior de la planta.

Mildiu

Esta enfermedad es causada por el hongo *Phytophthora sp* y se caracteriza por presentar generalmente manchas de color verde claro de manera irregular en las hojas, pero dependiendo de la temperatura, intensidad de la luz o humedad puede llegar a presentar diferentes sintomatologías. Por ejemplo, si se tiene temperaturas que oscilan entre 10 a 20°C dichas lesiones siguen progresando hasta provocar necrosis de color castaño o negro púrpura llegando a matar a la hoja y poco a poco la planta va perdiendo vigorosidad (Hernández & Plasencia, 2013).

Rhizoctoniosis

Esta enfermedad es causada por el hongo *Rhizoctonia sp* y se caracteriza por la excesiva humedad en los suelos mostrando pudrición, necrosis y ulceraciones en la zona del cuello de la raíz, luego con el tiempo se va hacia el tallo con el que llega a afectar el crecimiento y posteriormente el rendimiento del cultivo.

Nudo de la raíz

Esta enfermedad es producida por un nemátodo del género *Meloidogyne sp*. el cual se caracteriza por presentar a nivel de la planta el marchitamiento del follaje, pérdida de vigorosidad y disminuye la producción de frutos, los nemátodos se sitúan al nivel de la raíz una vez que parasitan la planta con lo cual se observa que esta presenta un engrosamiento haciendo que se pierda raíces secundarias y pelos absorbentes dando paso a que exista una disminución en la absorción de nutrientes y de agua (Revelo et al., 2008).

Marchitez Bacterial

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Pseudomonas solanacearum*, se caracteriza por presentar marchitamiento de las hojas presentando una tonalidad amarilla, las hojas van

cayendo al suelo y si la planta está en producción se observa que los frutos quedan adheridos a las ramas. Esta enfermedad puede llegar a causar la muerte de la planta.

Virus del rizado amarillo del tomate

Esta enfermedad se caracteriza por detener el crecimiento de las plantas cuando aún son pequeñas (hasta tener un mes de edad), pero después de ese periodo se puede observar en los folíolos que el crecimiento se reduce, el vector de este virus es la mosca blanca (*Bemisa tabaci*) (Torres & Florez, 2009).

Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas

Tal como su nombre lo indica “rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas” son aquellas bacterias provenientes de la rizosfera que son beneficiosas tanto a nivel de raíces, como del crecimiento general de las plantas, mediante mecanismos directos e indirectos (Hashem et al., 2019). En el caso de los métodos directos, las bacterias mejoran la disponibilidad de elementos nutricionales los cuales mejoran el proceso de nutrición de la planta y también son requeridos para los procesos metabólicos, mientras que los procesos indirectos ocurren cuando las rizobacterias disminuyen o eliminan por completo a microorganismos fitopatógenos ya sea por la elaboración de elementos antibióticos y antimicrobianos (Moreno et al., 2018).

Las rizobacterias también elaboran enzimas líticas las cuales brindan defensas naturales de la planta tales como la resistencia sistemática hacia microorganismos patógenos, elaboración de sideróforos que atrapan Fe disponible en el suelo y con ello se logra una disminución del desarrollo y presencia de dichos microorganismos, productividad de cianuros de hidrógeno y antibióticos, e inhibición del desarrollo de la pared fúngica mediante la hidrólisis de partículas de ácido fusárico, entre otros.

Otras aplicaciones que se les puede dar a los PGPR en el medio ambiente es la fitorremediación para desintoxicar contaminantes, aplicación como rizoremediación para eliminar organismos contaminantes mediante la interacción de estos con la rizosfera ya sean

estos contaminantes orgánicos y de metales, aplicación como biocontrol para eliminar fitopatógenos y aplicación para revegetación y reforestación (Benjumeda, 2017).

Bacillus

El género *Bacillus* son bacterias gram positivas que a su vez pueden ser aerobias y anaerobias facultativas, la forma de las endosporas puede ser ovoide o redonda la cual le ayuda a resistir condiciones adversas en el medio en que se encuentre. Esta familia de bacterias es considerada de suma importancia ya que generan enzimas hidrolíticas policelulares mismas que deponen los compuestos disponibles en el suelo tales como lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos con lo cual son utilizados como controladores biológicos o para la elaboración de productos metabólicos (Caicedo & Chacón, 2017).

Bacillus subtilis

Características macroscópicas y microscópicas.

B. subtilis es una bacteria bacilo Gram-positivo, aerobio no estricto, productora de endosporas que se encuentra comúnmente en el suelo. Las colonias son de color blanco opaco, elevación plana de forma irregular y con margen ondulado, su observación en el microscopio electrónico de barrido las células presentan flagelos peritricos que le proporcionan movilización (Chen et al., 2008).

Producción de endosporas.

B. subtilis pasa parte de su existencia de una forma inactiva, como una estructura llamada endospora, en este estado su metabolismo se detiene, a pesar de ello, tienen la capacidad de monitorizar de forma continua el estado nutricional de su entorno y cuando los nutrientes son apropiados germinan y crecen vegetativamente (Nicholson et al., 2000).

Las endosporas son una estrategia para asegurar su supervivencia, ya que permiten a las bacterias resistir condiciones locales nutricionalmente desfavorables, propagarse a través del viento, agua, seres vivos, y tener un mayor grado de resistencia a algunos factores como: calor húmedo y seco, radiación UV y gamma, desecación seca y agente oxidantes. Estas

cualidades convierten a *B. subtilis* en un buen candidato para la producción de bio-productos (Errington, 2003; Yáñez-Mendizabal et al., 2011).

B. subtilis como control biológico.

B. subtilis ha demostrado tener una gran capacidad para impedir el desarrollo micelial y la reproducción de conidios de *C. acutatum* (Yáñez-Mendizabal & Falconí, 2018). Los extractos de lipopéptidos, específicamente fengicinas, tienen una fuerte actividad antifúngica contra *C. acutatum*. (Yáñez-Mendizabal & Falconí, 2021). Estas moléculas de lipopéptidos, presentan baja virulencia, alta capacidad de degradación y propiedades “amigables” con el medio ambiente (Chen et al., 2008).

Al *Bacillus subtilis* también se lo conoce como *Rhizobacterium* ya que tiene la capacidad de sintetizar fitohormonas como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas y citoquímicas todos estos mejoran el desarrollo de la raíz. También se presume que ésta mejora la adaptación de los cultivos en el suelo ya que recubre a la semilla lo cual ayuda a la salud, germinación y vigor (Méndez-Úbeda et al., 2018).

Además, la producción de endosporas y la resistencia a altas temperaturas facilita el secado y posterior formulación por atomización de *B. subtilis*, sin que su eficacia como biocontrolador se vea afectada (Yáñez-Mendizabal et al., 2011).

B. subtilis como promotor de crecimiento.

Las bacterias tienen la capacidad de generar varias hormonas que tienen influencia en el crecimiento de las plantas, como por ejemplo las auxinas que tienen un impacto favorable en la multiplicación de semillas, también se menciona la producción de citocininas en la rizosfera, ácido indol acético y ácido abscísico los cuales influyen positivamente en el crecimiento vegetal Intervienen en la solubilización de fosfatos el cual solubilizan los fosfatos insolubles para que estén disponibles para las plantas. También ayudan a la fijación de nitrógeno atmosférico mediante el complejo enzimático de nitrogenasa (posee 2 proteínas dinitrogenasa y

dinitrogenasa reductasa) los cuales transforman el nitrógeno atmosférico en amoníaco (Moreno et al., 2018).

En un estudio realizado en el Valle del Yaqui (México) se utilizaron cepas de cuatro bacterias y un testigo en el cultivar de nogal como promotores de crecimiento sobre la productividad y calidad, una de las bacterias utilizadas fue *Bacillus subtilis*. El periodo de estudio fue de 3 años, determinando que con la aplicación de estas cepas se incrementó significativamente el rendimiento respecto al testigo, de igual modo se favoreció la absorción de nutrientes lo que se reflejó en un aumento del porcentaje de la nuez en un 27,7%; se sugiere el uso continuo de las bacterias para corroborar el aumento en la producción del cultivo (Cantú et al., 2021).

En otro estudio realizado en Tumbaco - Quito (Ecuador) se utilizó *B. subtilis* como promotor de crecimiento en el cultivar de brócoli. Los días de formación comercial de la pella, altura de la planta, diámetro, peso y rendimiento de la pella se incrementaron significativamente demostrando que la bacteria favorece positivamente en el desarrollo de la planta mediante la elaboración de ácido indol acético, mejorando la absorción de los nutrientes especialmente el fósforo y estimulando la elaboración de fitohormonas (Bunce, 2020).

Capítulo III

Metodología

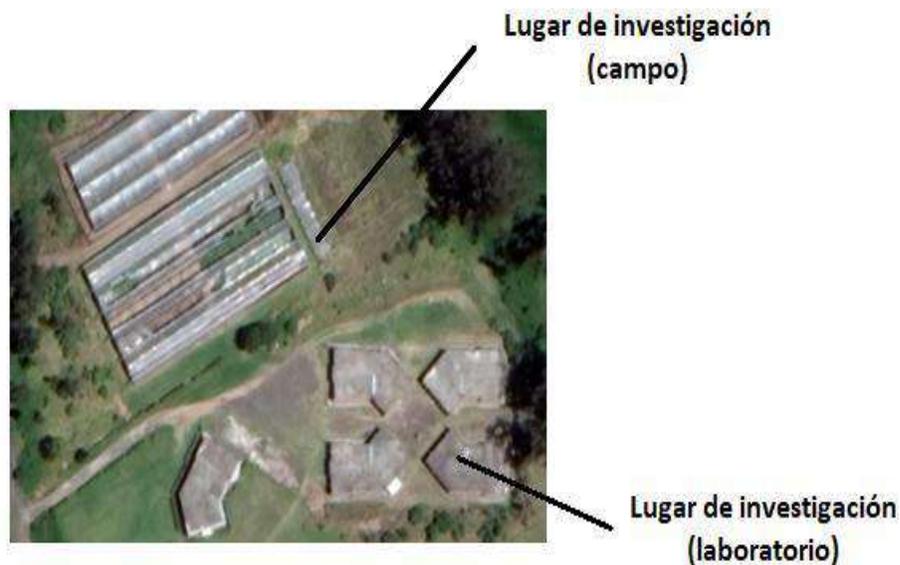
Ubicación del lugar de investigación

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, ubicados en la Hacienda “El Prado”, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

La otra fase en un invernadero de la Hacienda “El Prado” ubicada también en la Hacienda “El Prado” en el barrio San Fernando, en las coordenadas UTM Latitud: 0°, 23’, 20” S y longitud: 78°, 24’, 44” O a una altitud de 2748 m.s.n.m.

Figura 1

Visión satelital del área de estudio



Nota. La figura representa la ubicación del sitio de estudio (campo y laboratorio). (Google Earth, 2021).

Materiales

Insumos

Se utilizarán los siguientes insumos: vasos de precipitación, frascos tarados, matraz Erlenmeyer, probetas, cajas de Petri, pipetas, puntas de pipetas, tubos de ensayo, gradillas, espátula, asas de inoculación, mechero de alcohol, cloro, alcohol, rizotrones, parafilm, papel aluminio, papel filtro, rollos de papel periódico, placas de pesaje de plástico, equipo de filtración al vacío, marcadores, botellas plásticas de 2 litros, barreno, contenedor de plástico, cinta métrica, termómetro y tubos de centrifuga de 50 ml.

Medios de cultivo

Se utilizarán los siguientes materiales: Agar nutritivo levadura dextrosa (NYDA), solución amortiguadora fosfato (TP) y agua destilada

Biológicos

Plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* var Amarillo puntón) en etapa fenológica vegetativa 2-3 hojas verdaderas, *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y Ctpx3-5.

Equipos

Se utilizarán los siguientes equipos: cámara de flujo laminar, agitador orbital, incubadora, vórtex, balanzas, autoclave, espectrofotómetro, medidor de clorofila (OPTI-SCIENCES CCM-200 plus), baño maría digital, contador de colonias manual y compresor.

Métodos

Cepas de *B. subtilis*

Los materiales biológicos a ser utilizados se obtuvieron del banco de cepas del laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Originalmente las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 se obtuvieron de vainas y semillas de chocho, los cuales demostraron inhibir el desarrollo micelial y reproducción de *C. acutatum* en semillas (Yáñez-Mendizábal & Falconí,

2018) y promover radículas y plúmulas a partir de semilla de chocho (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021).

Preparación de inóculo de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5

Para la preparación del inóculo se utilizó las cepas de *Bacillus subtilis* activadas y preparadas en un medio de bajo coste el cual está formulado con fuente de nitrógeno y carbono a base de soya 40 g L⁻¹, melaza 2 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.9 g L⁻¹ y sales de MOLP. Después fueron sembrados en medio NYDA e incubados a una temperatura de 30 °C durante 24 horas (Yáñez-Mendizábal et al., 2011). Estas cepas se mantienen a -80°C en criobolas para su uso a largo plazo (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021).

Control de calidad de *B. subtilis* crecido en un medio de bajo costo

Se prepararon banco de dilución con 9 ml de solución buffer en tubos de ensayo. Se tomó una muestra de 10 ml del medio de bajo coste y se añadió a un frasco Erlenmeyer con 90 ml de solución buffer, esta fue la dilución 10⁻¹, a partir de esta dilución se realizaron diluciones crecientes hasta 10⁻⁷. Mediante plateo en medio NYDA (8 g l⁻¹ caldo nutritivo, 5 g l⁻¹ extracto de levadura, 10 g l⁻¹ dextrosa y 20 g l⁻¹ agar) se realizó este proceso para cuantificar la población viable y expresarla en UFC/ml (Yáñez-Mendizábal et al., 2011). Este proceso se lo repitió cada 15 día con cada nuevo lote de inóculo.

Preparación de células y sobrenadante de *B. subtilis*

En tubos de 50 ml se colocaron muestras de *B. subtilis* y se centrifugó a 6000 RPM durante 10 min (3 repeticiones) para separar sobrenadante de células. Adicionalmente, el sobrenadante fue filtrado con la ayuda de un equipo de filtrado utilizando un filtro de 0.22 µm de diámetro. La turbidez del sobrenadante fue evaluada mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 300 nm en intervalos de 1h hasta completar 6 observaciones y de esta manera construir la curva de la población viable, el blanco fue el medio de cultivo líquido sin inocular.

Establecimiento de plantas en el invernadero

En un invernadero se instalaron 5 rizotrones (1.0 metros de largo x 0.5 metros de ancho x 0,4 metros de profundidad). Plantas de tomate fueron obtenidas a partir de semilla y una vez que tuvieron de 2-3 hojas verdaderas (2 meses de edad) fueron seleccionados por similar tamaño. Las plántulas fueron trasplantadas de tal manera que las raíces quedaron directamente pegado al vidrio del rizotrón.

Figura 2

Instalación de los rizotrones en el lugar de estudio



Figura 3

Trasplante de las plantas de tomate de árbol (2 meses de edad) a los rizotrones

***Inoculación de *B. subtilis* Ctpx 2-1 y Ctpx 3-5 en plantas de tomate de árbol***

Una vez separado las células del sobrenadante de las suspensiones de *B. subtilis* CtpxS2-1 y Ctpx3-5 crecidos en medio de bajo coste, para la inoculación de los tratamientos en las plantas de tomate se prepararon 1800 ml (300 ml por planta) de inóculo de solución amortiguadora fosfato con *Bacillus* por tratamiento. En el caso de las células fue necesario tener una concentración de 2×10^6 UFC/ml, si la concentración sobrepasaba la concentración antes mencionaba utilizamos la siguiente fórmula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde:

C_1 : Es la concentración madre o inicial

V_1 : Es el volumen que se necesita de la solución madre o inicial

C_2 : Es la concentración de la solución final

V_2 : Es el volumen final de la solución final

Antes de la segunda inoculación y así sucesivamente, utilizando un barreno se colectaron muestras de suelo más rizosfera de forma aleatoria y se pesó 10 gr y se realizaron bancos de dilución para su posterior plateo con la finalidad de determinar la dinámica poblacional, por cada tratamiento.

Variables a medir

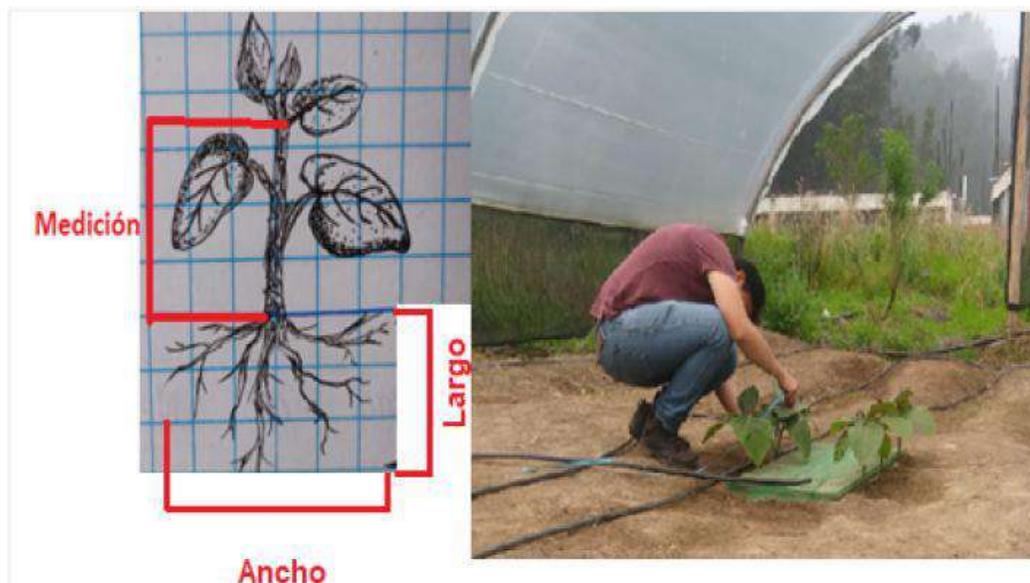
Altura de planta y colonización de raíz

Para medir la altura de la planta se utilizó una cinta métrica desde la base del cuello del tallo hasta la parte más alta del entre nudo del tallo. Se anotaron los datos obtenidos en una tabla, cada 15 días durante 3 meses.

Para la colonización de raíz se pesaron 10 gramos de raíces de cada tratamiento, fueron lavados con agua común y enjuagados con agua destilada esterilizada. Una vez secas se la añadió a un frasco Erlenmeyer con 90 ml de solución buffer, a partir de este se realizaron diluciones crecientes hasta 10^{-7} , que fueron sembrados en el medio NYDA e incubaron a 30°C durante 24 horas. Las colonias se contabilizaron tomando en cuenta su morfología con ayuda de un contador de colonias manual (Tlapal et al., 2014).

Figura 4

Medición de la altura de las plantas de tomate de árbol



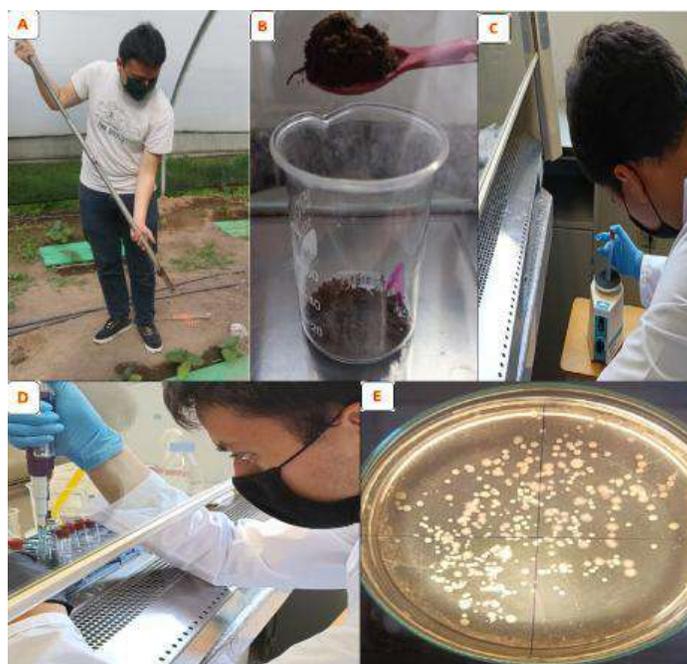
Nota. El dibujo representa los parámetros que se tomaba en cuenta para tomar la altura de la planta. Elaborado por el autor.

Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

Para la dinámica poblacional se recolectaron 10 gramos de suelo con rizosfera, utilizando un barreno, se colocaron en matraz Erlenmeyer completamente estéril con 90 ml de solución buffer y se agitaron durante 30 minutos en agitador orbital para tener así la dilución de 1×10^1 , a partir de ésta, se realizaron diluciones crecientes en agua peptonada hasta obtener una dilución de 1×10^6 (Calvo et al., 2008) luego fueron sembrados en el medio NYDA y posteriormente incubados 30°C durante 24 horas y por último se contabilizaron las colonias como antes descrito. Con los datos colectados cada 15 días, se construyó una gráfica de la población viable y total.

Figura 5

Procedimiento para la dinámica poblacional de B. subtilis



Nota: En la figura A) Toma de la muestra de suelo más rizosfera con la ayuda de un barrenado; B) Pesaje de 10 gr de muestra de suelo más rizosfera; C) Homogenización de las diluciones realizadas; D) Proceso de siembra de las muestras en medio NYDA; E) Contabilización de colonias de *B. subtilis*

Índice de contenido de clorofila

Para el índice del contenido de clorofila se realizaron lecturas a 3 folíolos de las hojas cada 15 días durante 3 meses, con la ayuda del medidor de clorofila CCM-200 Chlorophyll Content Meter (opti-Sciences). Los datos obtenidos serán medidos en Índice de Concentración de Clorofila (ICC).

Peso fresco y peso seco de raíces, tallos y hojas

El peso fresco y peso seco se determinó mediante el porcentaje de humedad de la plántula por tratamientos al final de los 3 meses. La fórmula es la siguiente

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

En el cual **Pi** se lo consideró como peso fresco de la planta y **Pf** se lo consideró como peso seco de la misma, para este último se dejó la materia fresca en la estufa a 70°C durante 72 horas. Para este proceso se sacaron los pesos frescos, secos y % de humedad de hojas, tallos y raíces por separado.

Figura 6

Peso fresco y seco de hojas, tallos y raíces



Área de raíces

Para calcular el área de raíces se utilizó el software Digital imaging of root traits (DIRT), el cual nos ayudó a observar rasgos fenotípicos de las raíces de estas dicotiledóneas a partir de fotografías digitales. Las variables medidas con este programa fueron longitud y diámetro.

Figura 7

Medición del área radicular con la ayuda del software DIRT



Diseño Experimental

El ensayo se estableció con un diseño completamente al azar (DCA) con dos cepas de *B. subtilis* (Ctpx2-1 y Ctpx3-5) y dos métodos de aplicación (células y sobrenadantes) con tres repeticiones y un testigo. Se emplearon 15 unidades experimentales conformadas por 2 plantas de tomate de árbol como unidad muestral.

Análisis estadístico

Los factores evaluados fueron; Factor 1: Cepa de *Bacillus*: 1. *B. subtilis* Ctpx2-1; 2. *B. subtilis* Ctpx3-5. Factor 2: Método de inoculación: 1. Células de *B. subtilis*; 2. Sobrenadante libre de células de *B. subtilis*.

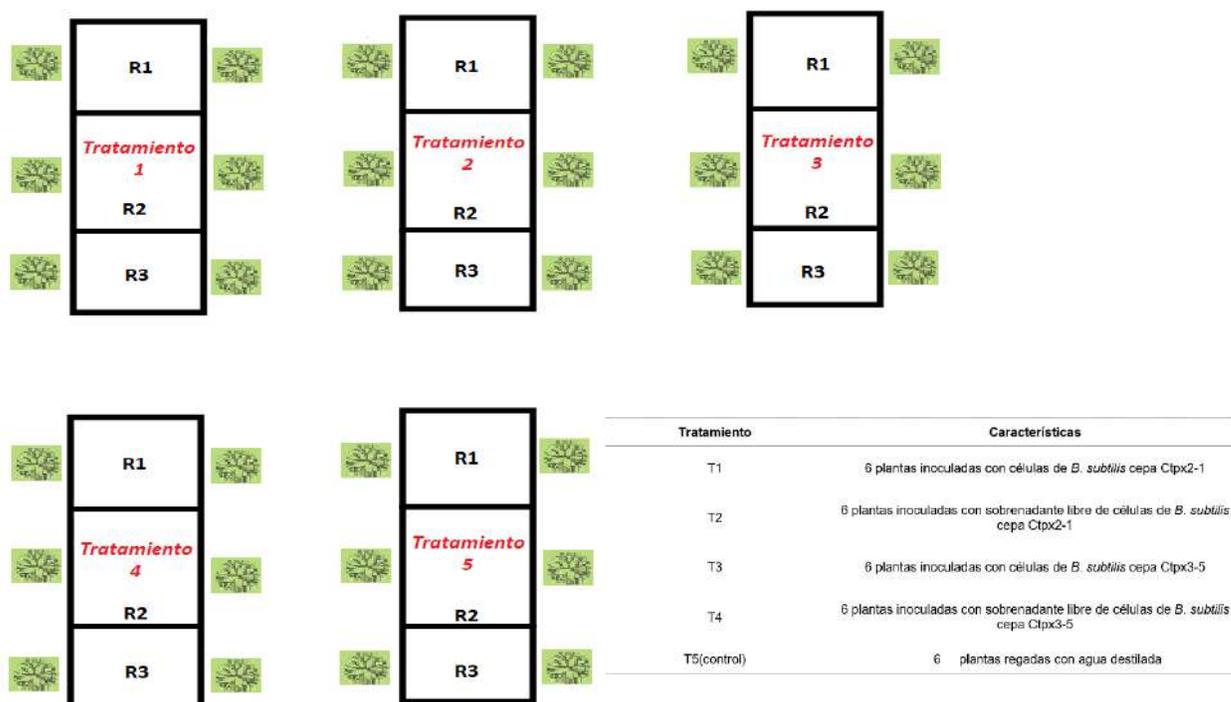
Tabla 1

Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Características
T1	6 plantas inoculadas con células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx2-1
T2	6 plantas inoculadas con sobrenadante libre de células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx2-1
T3	6 plantas inoculadas con células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx3-5
T4	6 plantas inoculadas con sobrenadante libre de células de <i>B. subtilis</i> cepa Ctpx3-5
T5(control)	6 plantas regadas con agua destilada

Figura 8

Croquis experimental del ensayo en campo



Nota. Elaborado por el autor.

El modelo matemático es el siguiente: $Y_{ijk} = \mu + C_i + M_j + CM_{ij} + T + E_{ijk}$

Donde,

Y_{ijk} = Desarrollo de las plantas de tomate de árbol

μ = Media General

C_j = Efecto de la i-ésima de *Bacillus subtilis*

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

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

E_{ij} = Error experimental

Tabla 2

Descripción de los contrastes

Contraste	Descripción
C1	$\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 - 4 \mu_5$ T1, T2, T3, T4 vs Testigo
C2	$\mu_1 + \mu_2 - \mu_3 - \mu_4 = 0$ T1, T2 vs T3, T4
C3	$\mu_1 + \mu_3 - \mu_2 - \mu_4 = 0$ T1, T3 vs T2, T4
C4	$\mu_1 - \mu_3 = 0$ T1 vs T3
C5	$\mu_2 - \mu_4 = 0$ T2 vs T4

Se realizó una prueba de comparación de Tukey 5% para la colonización de *B. subtilis* de células y sobrenadantes libres de células, se midieron las unidades formadoras de colonia una vez por cada 15 días durante 3 meses.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Altura de la planta

Las medias de las alturas entre las plantas tratadas con células y sobrenadantes de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 y Ctpx3-5 (T1: células Ctpx2-1; T2: sobrenadante Ctpx2-1; T3: células Ctpx3-5 y T4: sobrenadante Ctpx3-5) no presentaron diferencia significativa entre si durante toda la fase experimental, a comparación del Tratamiento control. Sin embargo, después de la segunda y tercera inoculación en las plantas tratadas con células y sobrenadante respectivamente de *B. Subtilis* Ctpx3-5, el promedio de la altura no fue estadísticamente significativo con respecto al control, esta tendencia se mantuvo hasta finalizar la fase experimental (Tabla 3).

Tabla 3

Análisis de varianza de altura de plantas por defecto de células o sobrenadantes de B. subtilis durante siete diferentes periodos de inoculación

<i>Primera inoculación</i>			<i>Segunda inoculación</i>			<i>Tercera inoculación</i>		
Tukey 5% DMS=1,44495			Tukey 5% DMS=2,0205			Tukey 5% DMS=3,50385		
Tratamiento	Medias		Tratamiento	Medias		Tratamiento	Medias	
T2	4,38	A	T1	6,58	A	T1	11,28	A
T1	4,32	A	T2	6,47	A	T2	10,32	A
T4	3,65	A	T4	5,85	A	T4	8,87	AB
T3	3,18	A	T3	4,4	AB	T3	8,42	AB
T5	1,15	B	T5	2,85	B	T5	5,75	B
<i>Cuarta inoculación</i>			<i>Quinta inoculación</i>			<i>Sexta inoculación</i>		
Tukey 5% DMS=4,51585			Tukey 5% DMS=7,04566			Tukey 5% DMS=7,14722		
T2	15,02	A	T1	20,68	A	T1	23,52	A
T1	13,25	A	T2	19,27	A	T2	22,32	A
T4	11,43	AB	T4	16,65	AB	T4	19,43	AB
T3	10,9	AB	T3	14,72	AB	T3	18,78	AB
T5	7,98	B	T5	11,52	B	T5	14,88	B

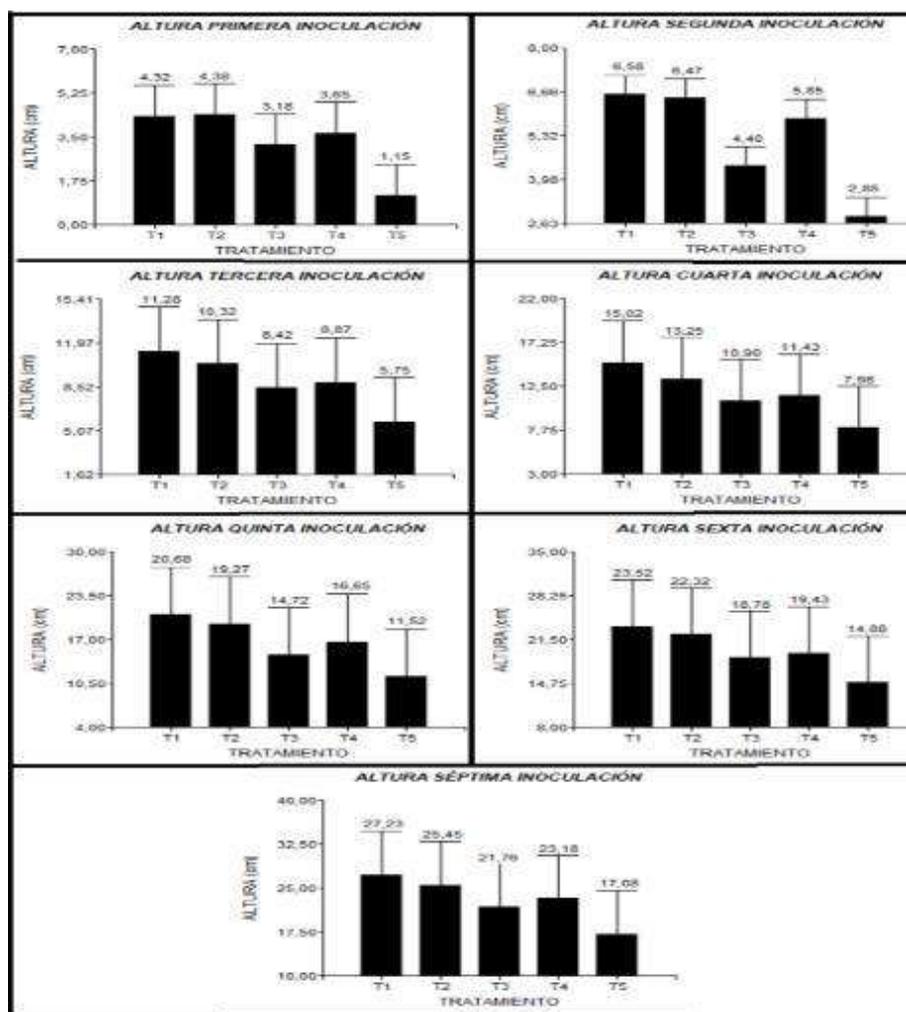
Séptima inoculación
Tukey 5% DMS=2,0205

Tratamiento	Medias	
T1	27,23	A
T2	25,45	A
T4	23,18	AB
T3	21,76	AB
T5	17,08	B

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey ($p > 0,05$).

Figura 9

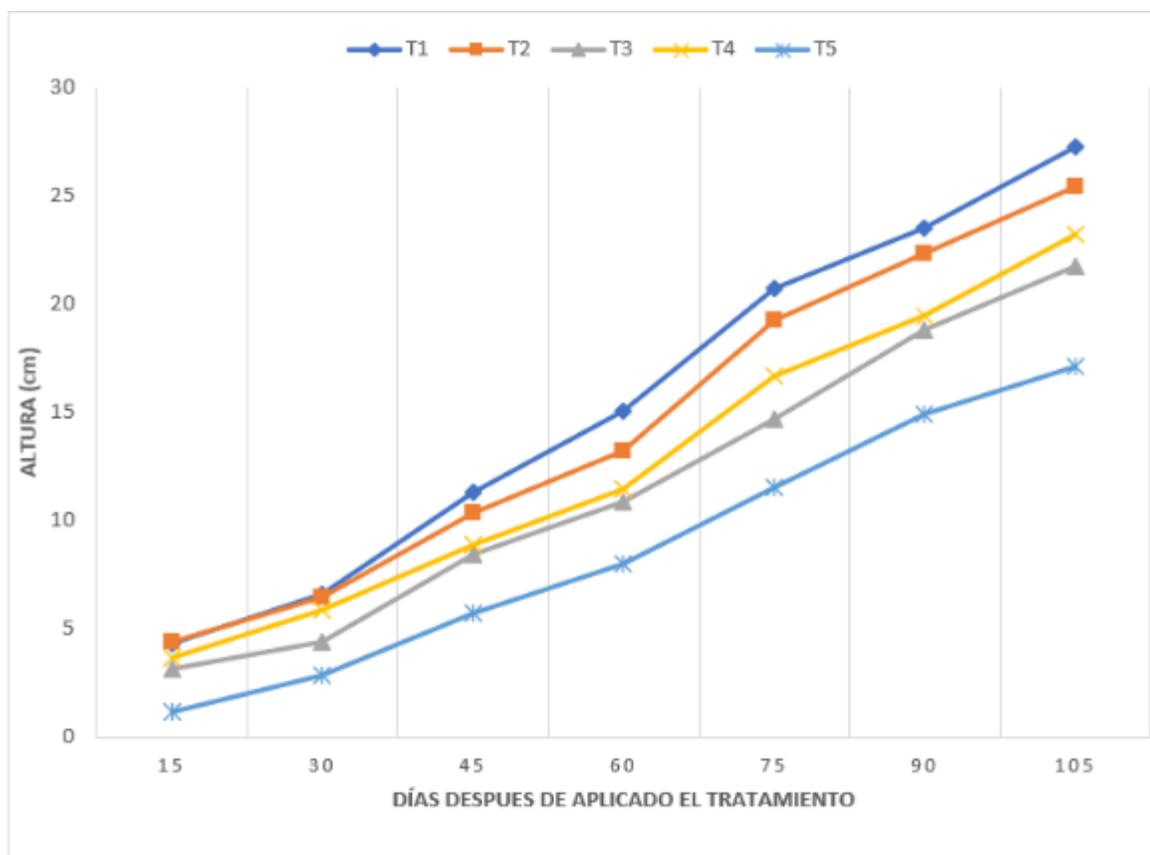
Altura de plantas de tomate de árbol por cada inoculación realizada por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de siete periodos de inoculación



Nota. Comparaciones de medias + desviación estándar.

Figura 10

Variación de la altura de las plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 105 días



Clorofila

Las medias del ICC entre las plantas tratadas con células y sobrenadantes de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 y Ctpx3-5 presentaron diferencia significativa siendo las plantas tratadas con células de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 las que mayores valores de ICC tuvieron con los demás tratamientos y el control, seguido del tratamiento de células de *B. Subtilis* Ctpx3-5 a partir de la tercera inoculación, además el sobrenadante de *B. Subtilis* Ctpx3-5 no mostró diferencia significativa comparado el T5 (control) durante la cuarta, sexta y séptima inoculación (Tabla 4).

Tabla 4

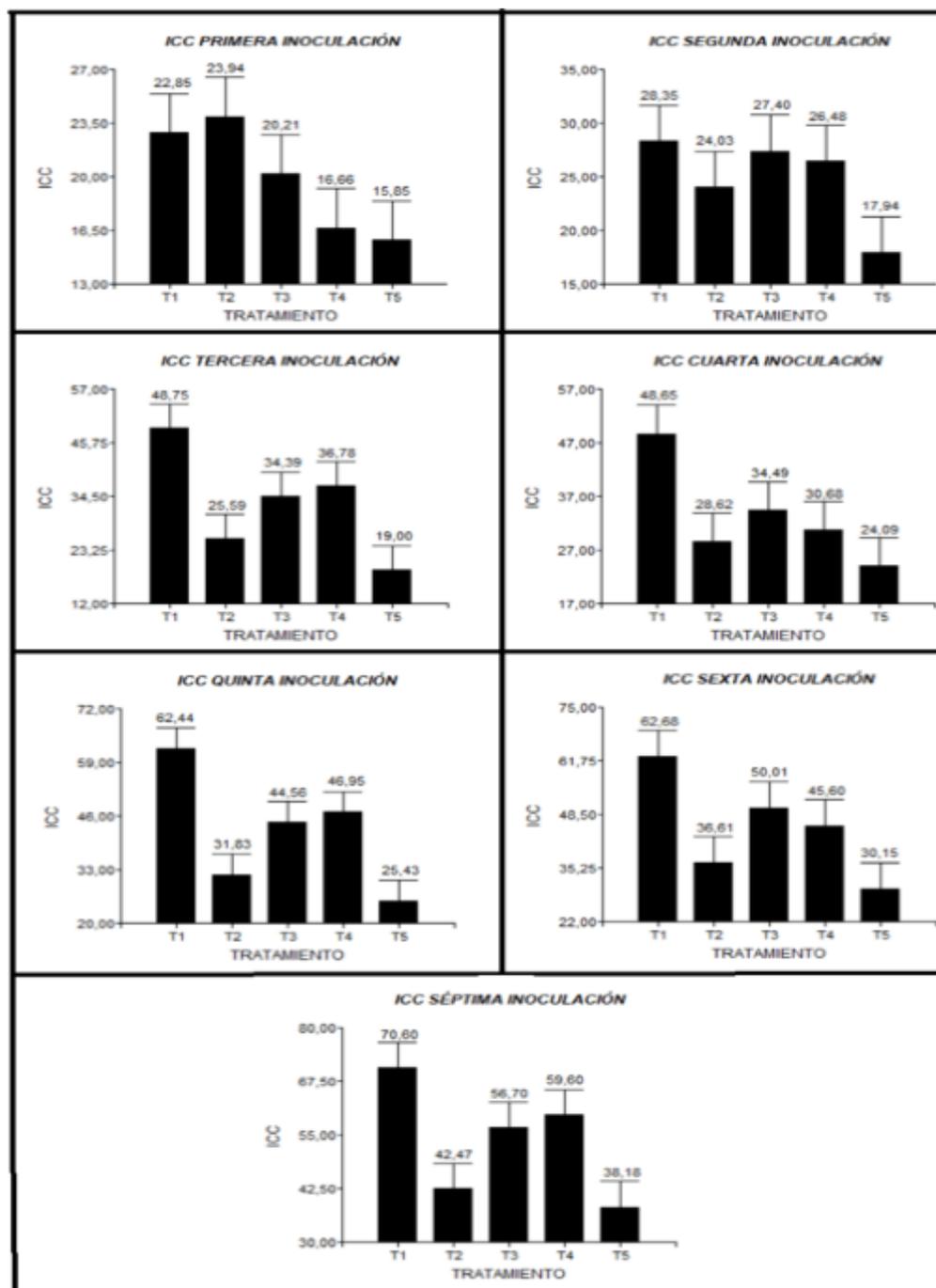
Análisis de varianza para el índice de Contenido de Clorofila de plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 7 diferentes periodos de inoculación

<i>Primera inoculación</i>			<i>Segunda inoculación</i>			<i>Tercera inoculación</i>		
Tukey 5% DMS=2,56574			Tukey 5% DMS=3,35498			Tukey 5% DMS=5,08185		
Tratamiento	Medias		Tratamiento	Medias		Tratamiento	Medias	
T2	23.94	A	T1	28,35	A	T1	48,75	A
T1	22.85	A	T3	27,4	A	T4	36,78	B
T3	20.21	B	T4	26,48	AB	T3	34,39	B
T4	16.66	C	T2	24,03	B	T2	25,6	C
T5	15.85	C	T5	17,94	C	T5	19	D
<i>Cuarta inoculación</i>			<i>Quinta inoculación</i>			<i>Sexta inoculación</i>		
Tukey 5% DMS=5,33137			Tukey 5% DMS=4,95001			Tukey 5% DMS=6,48210		
T1	48,65	A	T1	62,44	A	T1	62,68	A
T3	34,49	B	T4	46,95	B	T3	50,01	B
T4	30,68	BC	T3	44,56	B	T4	45,6	B
T2	28,62	CD	T2	31,83	C	T2	36,61	C
T5	24,09	D	T5	25,43	D	T5	30,15	C
<i>Séptima inoculación</i>								
Tukey 5% DMS=6,01563								
T1	70,6	A						
T4	59,6	B						
T3	56,7	B						
T2	42,47	C						
T5	38,18	C						

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey ($p > 0,05$)

Figura 11

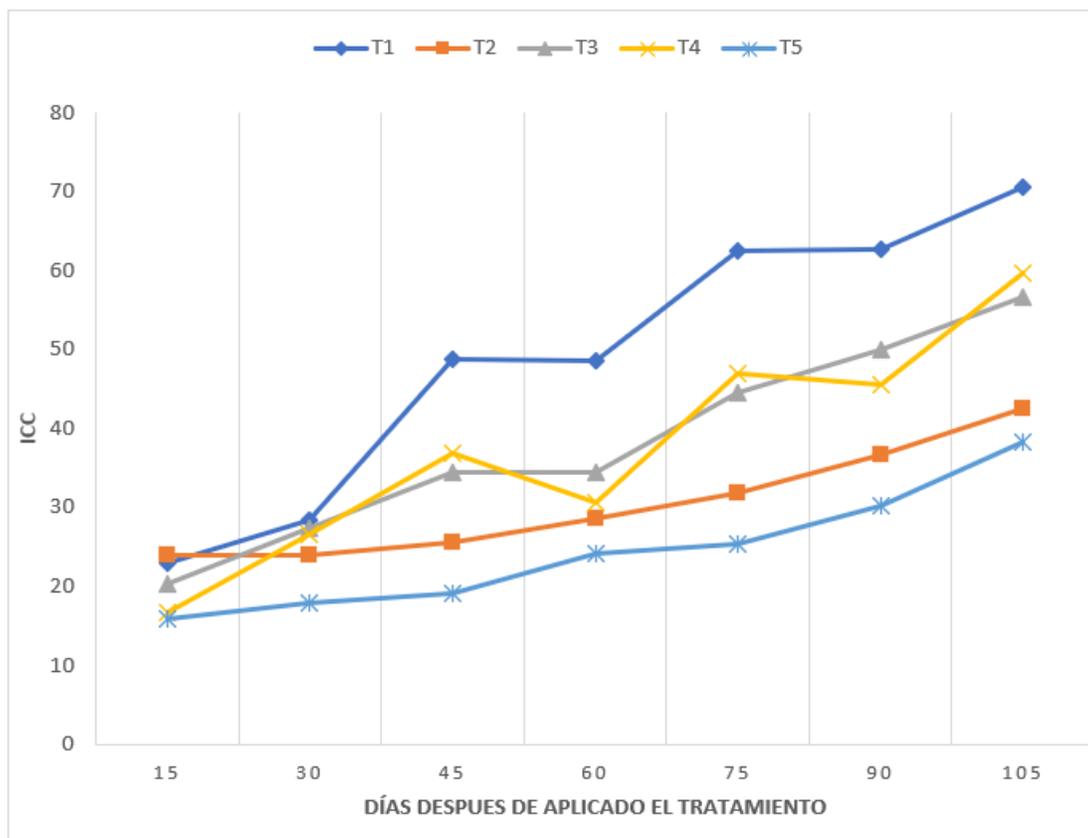
Índice del Contenido de Clorofila de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de siete inoculaciones



Nota. Comparaciones de medias + desviación estándar

Figura 12

Variación del Índice de Contenido de Clorofila de plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* inoculadas a lo largo de 105 días



Área raíz

Las medias del área de raíz entre las plantas tratadas con células y sobrenadantes de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 y Ctpx3-5 presentaron diferencia significativa siendo las plantas tratadas con células de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 las que mayores valores de área radicular presentaron seguido por las plantas inoculadas con células de *B. subtilis* cepa Ctpx3-5. Cabe mencionar que todos los tratamientos versus el tratamiento control tuvieron diferencia significativa durante todas las evaluaciones (Tabla 5).

Tabla 5

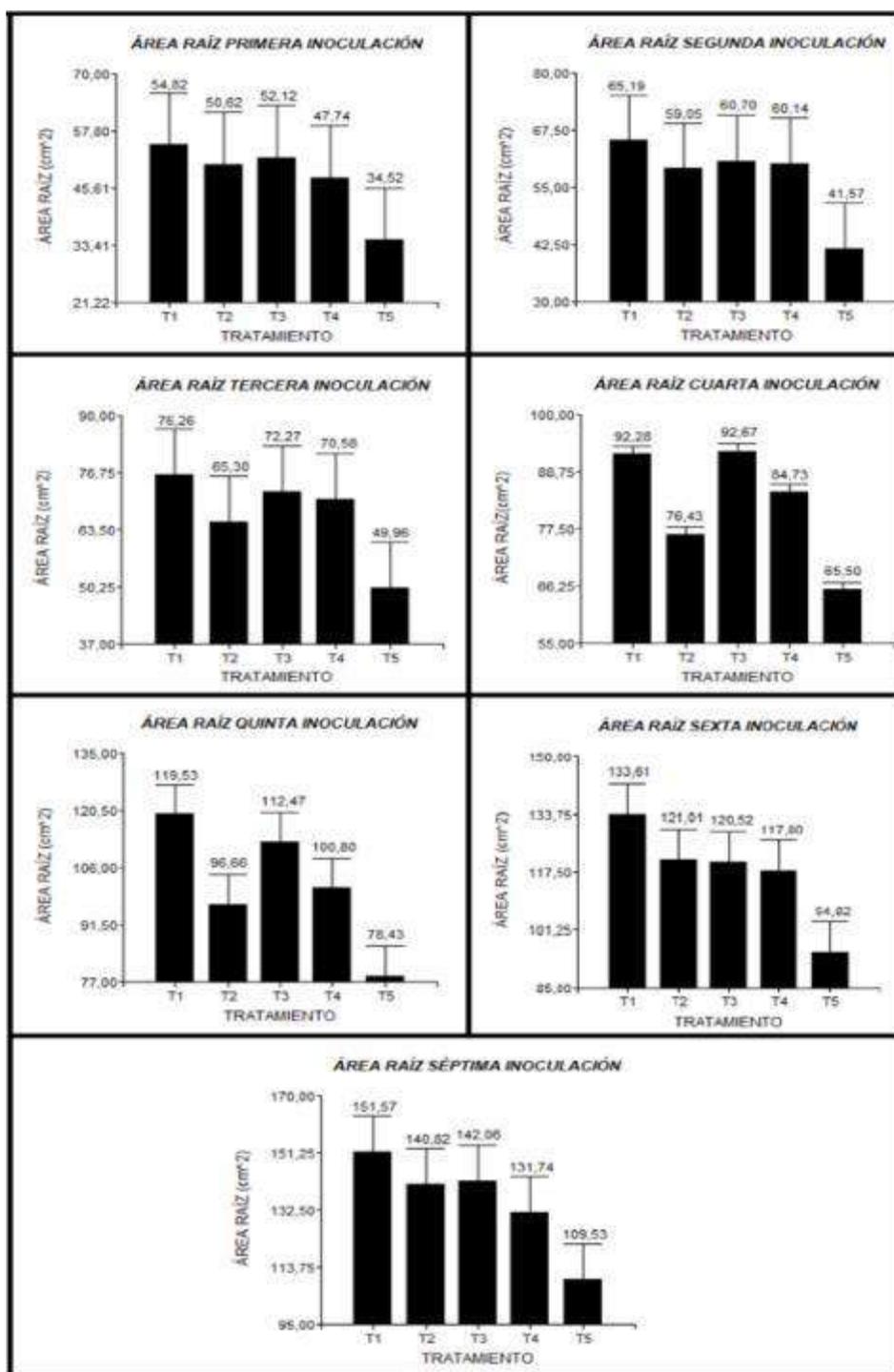
Análisis de varianza para el área de raíz de plantas de tomate de árbol por efecto de células o sobrenadantes de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 7 diferentes periodos de inoculación

<i>Primera inoculación</i>			<i>Segunda inoculación</i>			<i>Tercera inoculación</i>		
Tukey 5% DMS=11,3656			Tukey 5% DMS=9,99203			Tukey 5% DMS=10,63918		
Tratamiento	Medias		Tratamiento	Medias		Tratamiento	Medias	
T1	54,82	A	T1	65,19	A	T1	76,26	A
T3	52,12	A	T3	60,7	A	T3	72,27	AB
T2	50,62	A	T4	60,14	A	T4	70,58	AB
T4	47,74	A	T2	59,05	A	T2	65,3	B
T5	34,52	B	T5	41,57	B	T5	49,96	C
<i>Cuarta inoculación</i>			<i>Quinta inoculación</i>			<i>Sexta inoculación</i>		
Tukey 5% DMS=6,28166			Tukey 5% DMS=7,58181			Tukey 5% DMS=8,58873		
T3	92,67	A	T1	119,53	A	T1	133,61	A
T1	92,28	A	T3	112,47	AB	T3	121,01	B
T4	84,73	B	T2	112,11	B	T4	120,53	B
T2	76,43	C	T4	100,8	C	T2	117,81	B
T5	65,5	D	T5	78,43	D	T5	94,82	C
<i>Séptima inoculación</i>								
Tukey 5% DMS=11,778770								
T1	151,57	A						
T4	142,06	AB						
T3	140,82	AB						
T2	131,74	B						
T5	109,54	C						

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey ($p > 0,05$).

Figura 13

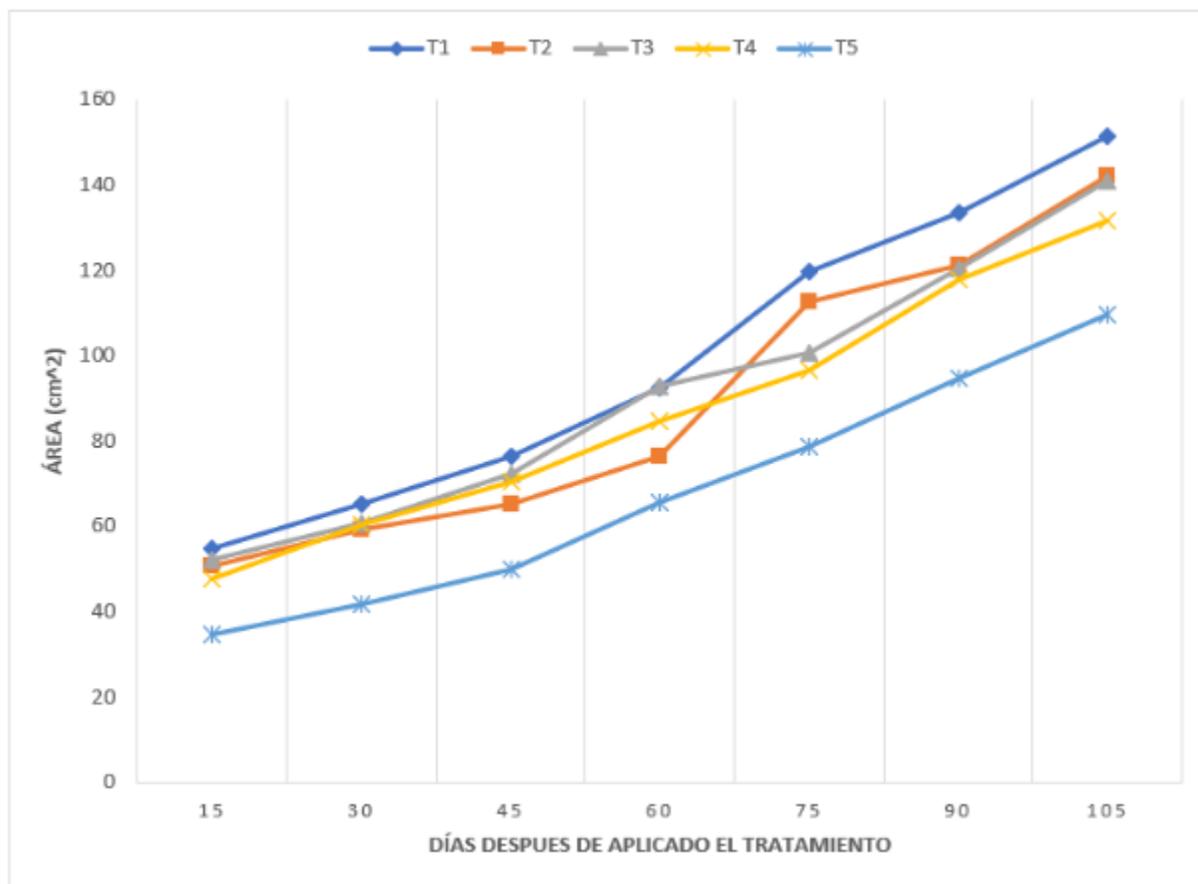
Área de raíz de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadante de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de siete inoculaciones



Nota: Comparaciones de medias + desviación estándar

Figura 14

Variación del área de raíz de plantas de árbol por efecto de células o sobrenadante de dos cepas de *B. subtilis* inoculadas a lo largo de 105 días

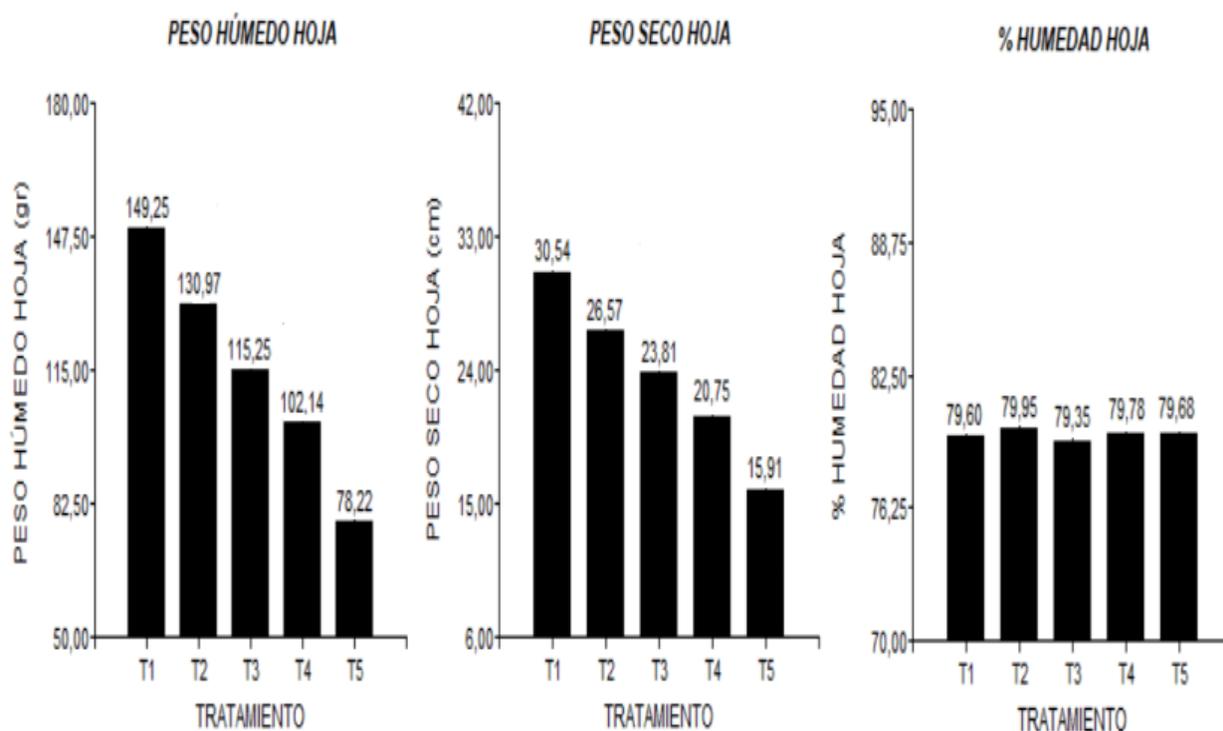


Peso fresco y peso seco

Las medias del peso fresco, peso seco y porcentaje de humedad entre las plantas tratadas con células y sobrenadantes de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en el caso de las hojas se obtuvo que las plantas inoculadas con células y sobrenadantes de *B. subtilis* Ctpx2-1 presentaron mayores valores de peso húmedo y seco que las plantas que fueron tratadas con células y sobrenadante de *B. subtilis* Ctpx3-5 y el tratamiento control pero, en el caso del porcentaje de humedad se obtuvieron datos similares para todos los tratamientos alrededor del 79% (Figura 15).

Figura 15

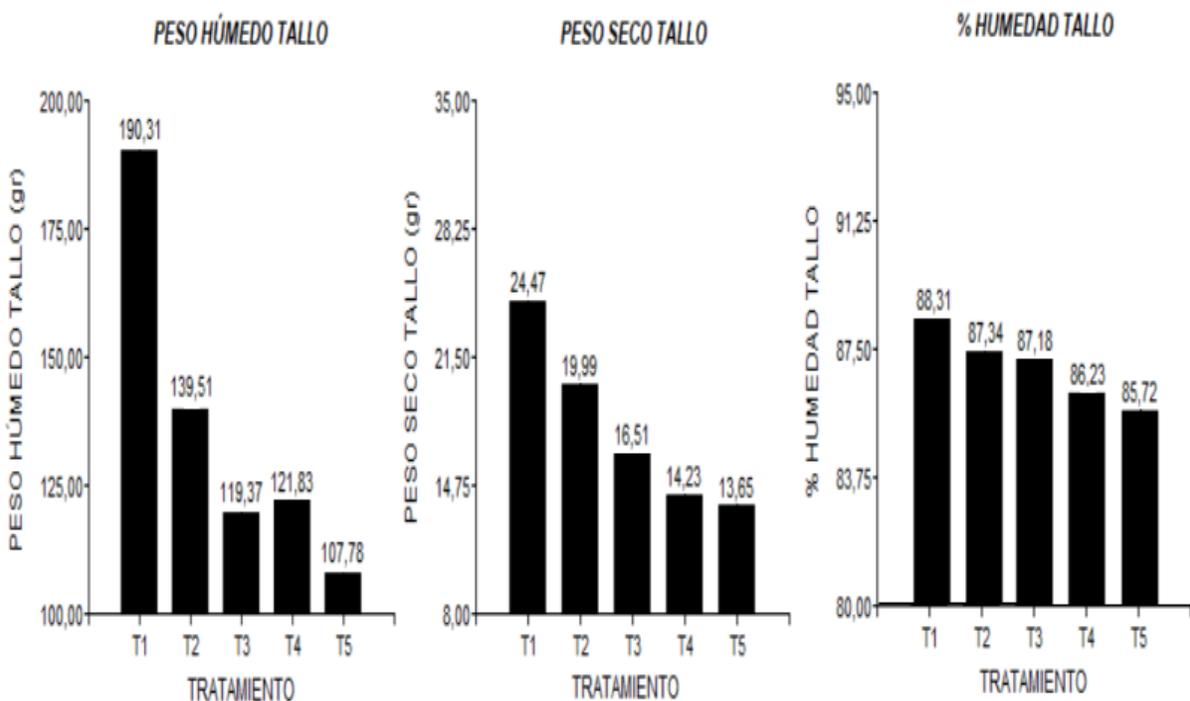
*Peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad de las hojas de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadante de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de siete inoculaciones*



En el caso del peso húmedo y peso seco del tallo se tuvo que las plantas inoculadas con células *B. subtilis* Ctpx2-1 presentaron mayores valores de peso húmedo y peso seco que los demás tratamientos incluyendo el control, en el porcentaje de humedad se obtuvieron datos similares para todos los tratamientos siendo el de mayor valor 88,31% y el menor de 85,72% (Figura 16).

Figura 16

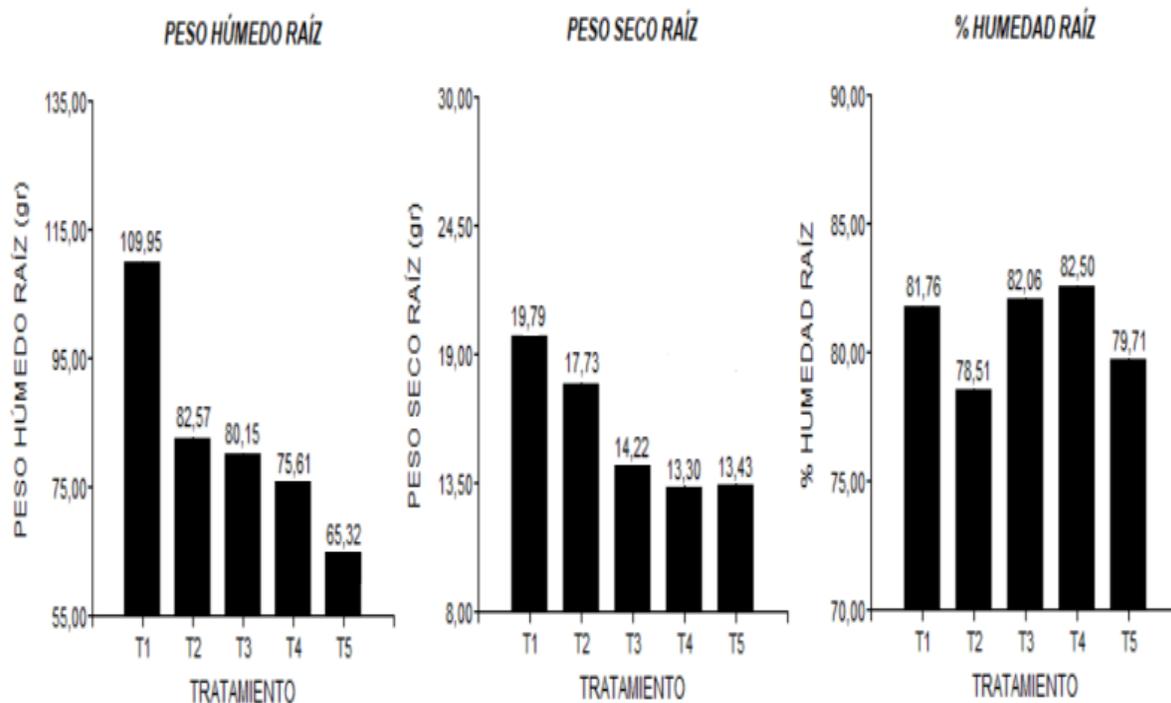
Peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad del tallo de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de siete inoculaciones



En el caso del peso húmedo y seco de la raíz se tuvo que las plantas inoculadas con de células *B. subtilis* Ctpx2-1 presentó mayores valores de peso húmedo que los demás tratamientos incluyendo el control, en el peso seco células y sobrenadante de *B. subtilis* Ctpx2-1 presentaron mayores valores y en el porcentaje de humedad se obtuvieron datos similares para todos los tratamientos siendo el de mayor valor 82,50% y el menor de 78,51% (Figura 17).

Figura 17

*Peso húmedo, peso seco y porcentaje de humedad de la raíz de plantas de tomate de árbol por efecto de la inoculación con células o sobrenadante de dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de siete inoculaciones*

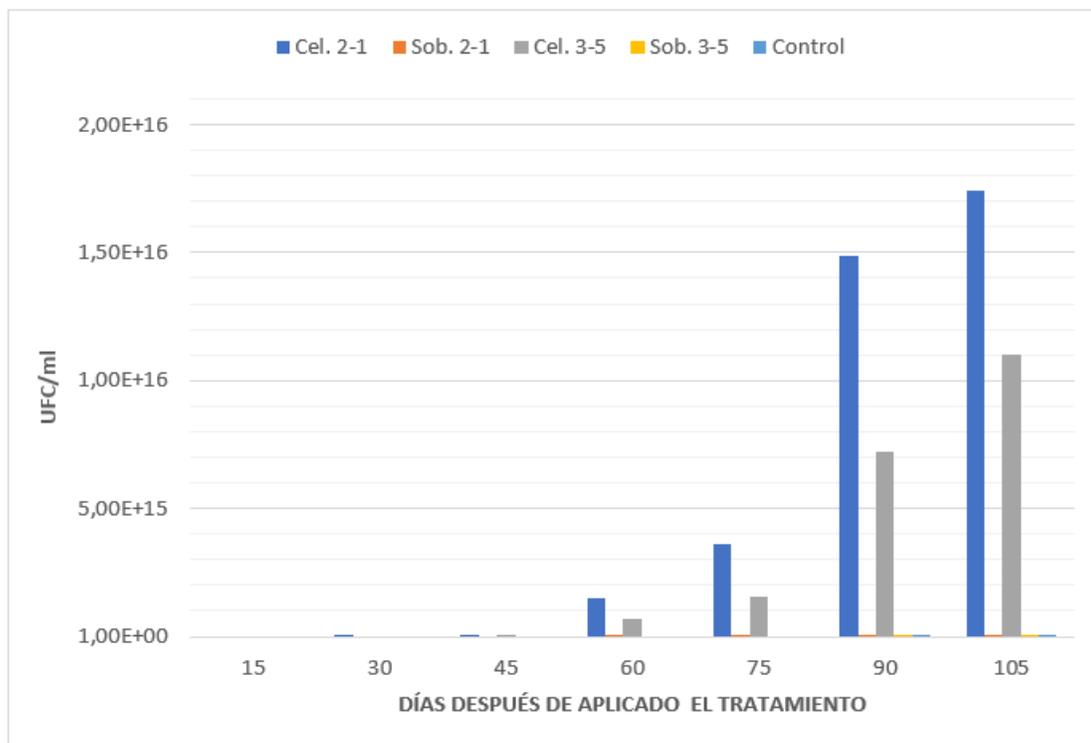


Dinámica poblacional de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5

Los datos recopilados sobre las muestras sacadas de rizosfera cada 15 días después de haber realizado la inoculación de células y sobrenadantes del *B. subtilis*, nos arroja que el tratamiento de células de la cepa Ctpx2-1 tuvo mayor número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) a partir de la segunda inoculación realizada hasta el final de la fase experimental con un valor de $1,74E+16$ y el de menor valor fue el testigo con $1,55E+11$ (Figura 18).

Figura 18

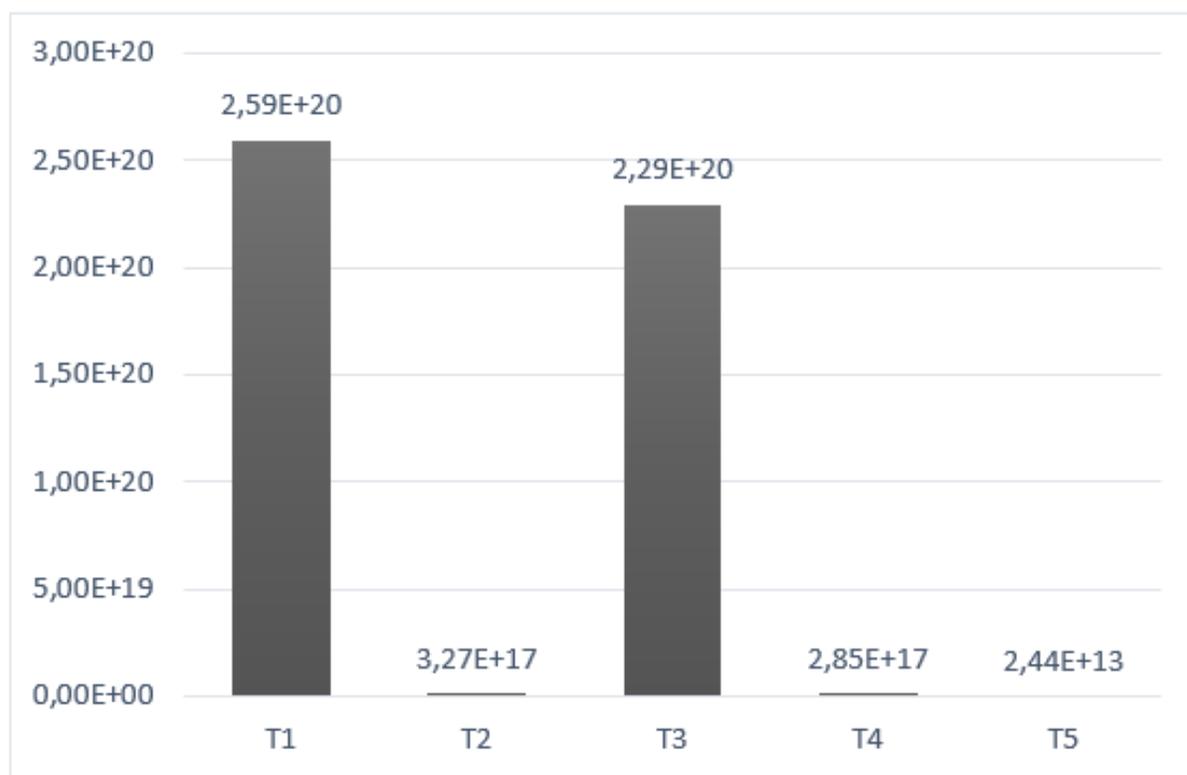
Dinámica poblacional de células y sobrenadantes de B. subtilis Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en la rizosfera de plantas de tomate de árbol a lo largo de siete inoculaciones



También se realizó el nivel de absorbancia de las dos cepas de *B. subtilis* desde el medio de bajo costo, los datos recopilados se los realizó mediante espectrofotometría con un barrido de 600 nm durante un periodo de 8 horas tomando una lectura cada hora con la ayuda del software ComBase. Los datos obtenidos fueron para el caso de la cepa Ctpx2-1 una absorbancia de 0,29, cepa Ctpx3-5 tuvo una absorbancia de 0.27 a las 8 horas. La cepa Ctpx2-1 tuvo un declive a partir de la 5 hora mientras que la cepa Ctpx3-5 fue a partir de la séptima hora (Figura 19)

Figura 19

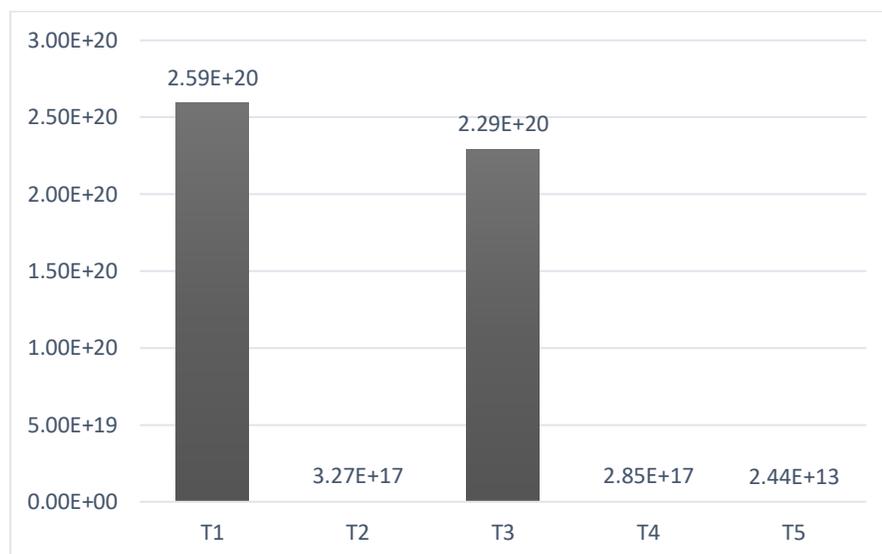
Nivel de absorbancia para los sobrenadantes de las cepas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 a lo largo de siete periodos de inoculación

**Colonización de Raíz**

La toma de muestras de los 10 gramos de raíz se tomó cuando culminó la fase experimental siguiendo el proceso descrito en metodología se obtuvo que las plantas inoculadas con células de *B. subtilis* Ctpx2-1 tuvo mayor número de unidades de formadoras (2,59E+20) seguido de las plantas inoculadas con células de *B. subtilis* Ctpx3-5 (2,29E+20) (Figura 20).

Figura 20

Colonización de la rizosfera de plantas de tomate de árbol de las cepas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 expresada en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml)



Los datos de las variables altura y porcentaje de humedad en el caso de inoculación de células de *B. subtilis* coinciden con un estudio realizado por Olivas et al., (2019) en el que menciona que la altura de las plantas de *Solanum lycopersicum* de los tratamientos aplicados (BSN, BS14 y BS86) versus el control tuvieron diferencia significativa siendo las plantas inoculadas con BS14 las que mayor altura obtuvieron como el caso de este estudio fue las plantas inoculadas con células de *B. subtilis* Ctpx2-1, pero también hubo una diferencia de resultados en las variables de área de raíz y pesos húmedos y secos de las plantas, debido a que el estudio realizado por Olivas et al., (2019) menciona que no existió diferencia significativa por los tratamientos de inoculadas con *B. subtilis* versus el testigo mientras que en este estudio se puede observar que las plantas tratadas con células de *B. subtilis* Ctpx2-1 tuvo mayor área foliar y pesos húmedos y secos comparados con los sobrenadantes y el control.

Los datos obtenidos de las plantas tratadas con sobrenadante libre de células coinciden con un estudio realizado por Jiménez, (2016) en el que utilizó cepas de *B. subtilis* EA-CB0575

en la promoción de crecimiento de *Zea mays* y *Solanum lycopersicum*, con las siguientes variables de respuesta: longitud aérea, peso seco aéreo, peso seco radicular y peso seco total. El estudio nos muestra que para las plantas de maíz hubo un porcentaje de aumento del 78% de las plantas tratadas con sobrenadante libre de células a comparación del testigo, mientras que para el tomate de árbol el valor fue del 85%.

El estudio realizado por Cusín, (2021) en plantas de chocho inoculadas con *B. subtilis* Ctpx2-1 obtuvieron mayores contenidos de clorofila en dos variedades de chocho (I-451 Guaranguito y F3(ECU 2658 x ECU 8415) con relación al testigo. Los datos obtenidos en este estudio concuerdan con lo anteriormente mencionado ya que el tratamiento con mayor índice de concentración de clorofila fue para las plantas inoculadas con células de *B. subtilis* Ctpx2-1 con un valor de 70.6, mientras que el tratamiento control solamente obtuvo un valor de 38,18 al final de la parte experimental Schlichting et al., (2015) mencionan que la adición de bacterias fijadoras de nitrógeno como este caso *B. subtilis* aumenta el contenido de clorofila en las plantas de trigo, mejorando así el desarrollo vegetativo y capacidad fotosintética.

La colonización de rizósfera en un estudio realizado por González, (2018) concluyó que la aplicación de inoculantes de *B. subtilis* en diferentes periodos de tiempo favorece la colonización de las raíces de las plantas por parte de los microorganismos y además mejoró los valores de crecimiento e índices de calidad. Los resultados obtenidos de las variantes agronómicas coinciden con lo anteriormente mencionado ya que se observa que la cepa de *B. subtilis* Ctpx2-1 tuvo mayores valores de colonización de rizosfera con lo cual tuvo mayores resultados de las variantes evaluadas con el control y en la mayoría de los demás tratamientos.

Conclusiones

- De acuerdo a la dinámica poblacional durante la fase experimental se obtuvo que las células de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 tuvo mayores resultados desde el inicio de la inoculación con un valor de $1,74E+16$ UFC/ml, le sigue el tratamiento de células de *B. subtilis* cepa Ctpx3-5 con un valor de $1,10E+16$ UFC/ml, luego tenemos al tratamiento de sobrenadante de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1 con un valor de $1,31E+13$ UFC/ml, le sigue el tratamiento de sobrenadante de *B. subtilis* cepa Ctpx3-5 con un valor de $1,54E+12$ UFC/ml y al control con un valor de $1,55E+11$ UFC/ml. En la colonización de raíz la cepa de células de *B. subtilis* Ctpx2-1 tuvo mayor número de unidades formadoras de colonia ($2,59E+20$) seguido de la cepa *B. subtilis* Ctpx3-5 ($2,29E+20$).
- El efecto de las células y sobrenadantes de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 sobre los parámetros agronómicos evaluados (altura planta, índice de concentración de clorofila, área de raíz, dinámica poblacional de la bacteria, colonización de raíz y peso seco y húmedo), siendo el tratamiento de células de *B. subtilis* Ctpx2-1 el que mejores resultados presentó en la mayoría de variables efectuadas como se describe en la parte de resultados.

Recomendaciones

- Para facilitar el proceso de sacado de raíz de las plantas de tomate se recomienda no trasplantar en el suelo mismo si no de realizarlo en sustrato. Tener en cuenta el distanciamiento de siembra del cultivo para no tener problemas con la toma de datos a futuro.
- Seguir con la investigación hasta el periodo de producción y cosecha ya que en el periodo de estado vegetativo la aplicación de células y sobrenadantes de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 presentaron resultados favorables en la promoción de crecimiento de la planta de tomate de árbol o también en otros cultivos de interés.

Bibliografía

- Benjumeda, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones* [Trabajo de titulación, Universidad de Sevilla]. <https://docplayer.es/71019350-Bacterias-promotoras-del-crecimiento-vegetal-mecanismos-y-aplicaciones.html>
- Bunce, R. (2020). *Efecto de la aplicación de Bacillus subtilis a tres frecuencias y tres dosis en brócoli* [Trabajo de Titulación, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22366/1/T-UCE-0004-CAG-274.pdf>
- Caicedo, S., & Chacón, J. (2017). *Pruebas bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. En Brassica oleracea var itálica y técnicas de conservación de cepas* [Trabajo de Titulación, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT11349.pdf>
- Calvo, P., Reymundo, L., & Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1), 141–148. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a17v7n1-2.pdf>
- Cantú, P., Gutiérrez, M., Castro, L., Soto, J., Cortéz, J., & Núñez, H. (2021). Microorganismos promotores de crecimiento sobre el rendimiento y calidad de Nogal Pecanero cultivado en el valle de Yaqui, Sonora, México. *Agrociencia*, 55(4), 347–354. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/2482/2066>
- Cerozi, B. da S., & Fitzsimmons, K. (2016). Use of *Bacillus* spp. to enhance phosphorus availability and serve as a plant growth promoter in aquaponics systems. *Scientia Horticulturae*, 211(1), 277–282. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2016.09.005>
- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 180–186. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02412.x>

- Cusín, E. (2021). *Respuesta de dos genotipos de chocho (Lupinus mutabilis) a la aplicación de dos alternativas para el control de antracnosis (Colletotrichum acutatum) Calderón, Pichincha* [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24878/1/T-IASA%20I-005708.pdf>
- Díaz, L., Canto, M., Orihuela, J., Mayta, C., & Otiniano, A. (2017). Sostenibilidad social de los subsistemas productivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en el Cantón Guachapala Provincia de Azuay – Ecuador. *Ecología Aplicada*, 16(2), 101–102.
<https://doi.org/10.21704/rea.v16i2.1013>
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- Feicán, C., Encalada, C., & Becerril, A. (2016). Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Agro Productividad*, 9(8), 78–86.
https://www.researchgate.net/publication/312938646_DESCRIPCION_AGRONOMICA_DE_L_CULTIVO_DE_TOMATE_DE_ARBOL_Solanum_betaceum_Cav
- González, H., & Fuentes, N. (2016). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17–31.
<https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- González, L. (2018). *Efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en la producción de plántulas de tomate (Solanum lycopersicum L.)* [Trabajo de Titulación, Instituto Tecnológico de Conkal].
https://conkal.tecnm.mx/images/POSGRADO_NEW/GEN_2016-2018/Ligia%20Paola%20Gonz%C3%A1lez%20Wilches.pdf

- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.05.004>
- Hernández, C., & Plasencia, J. (2013). *Biocontrol del mal del semillero, enfermedad causada por hongos Pythium sp. y Phytophthora sp. en tomate de árbol (Solanum betaceum) empleando hongos antagonistas del género Trichoderma sp. a nivel de semilleros* [Trabajo de Titulación, Universidad Politécnica Salesiana].
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3725/1/UPS-CT002576.pdf>
- Jiménez, A. C. P. (2016). *Evaluación del efecto de Bacillus subtilis EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de Zea mays y Solanum lycopersicum a nivel de invernadero* [Trabajo de Titulación, Universidad EAFIT].
https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/9735/AnaCarolina_PulidoJimenez_2016.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- León, J., Viteri, P., & Cevallos, G. (2004). *Manual del cultivo de tomate de árbol*. INIAP.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/827/4/iniapscm61.pdf>
- MAGAP. (2016). *La política agropecuaria ecuatoriana: hacia el desarrollo territorial rural sostenible*. MAGAP. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu183434.pdf>
- Méndez-Úbeda, J., Flores Hernández, M., & Páramo-Aguilera, L. (2018). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96–110.
<https://doi.org/10.5377/NEXO.V30I2.5530>
- Mishra, P., Mishra, J., & Arora, N. (2021). Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants – Recent developments and prospects: A review. *Microbiological Research*, 252(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2021.126861>

- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J., & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Olivas, A. F., Cabello, A., Olivas, F., Portugal, O., Valdés, A., & Alcalá, L. (2019). Evaluation of Bacillus subtilis as promoters of plant growth Evaluación de cepas de Bacillus subtilis como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6, 1–13.
<https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>
- Ramírez, F., & Kallarackal, J. (2019). Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) reproductive physiology: A review. *Scientia Horticulturae*, 248(1), 206–215.
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.01.019>
- Revelo, J., Mora, E., gallegos, P., & Garcés, S. (2008). *Enfermedades, nematodos e insectos plaga del tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.)*. INIAP.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/513/5/iniapscbt115.pdf>
- Schlichting, A. F., Bonfim-Silva, E. M., de Silva, M. C., Pietro-Souza, W., da Silva, T. J. A., & Farias, L. D. N. (2015). Efficiency of portable chlorophyll meters in assessing the nutritional status of wheat plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(12), 1148–1151. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/AGRIAMBI.V19N12P1148-1151>
- Tlapal, B., González, H., Zavaleta, E., Sánchez, P., Mora, G., & Nava, C. (2014). Colonización de Trichoderma y Bacillus en Plántulas de Agave tequilana Weber, var. Azul y el Efecto

Sobre la Fisiología de la Planta y Densidad de Fusarium. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(1), 62–74. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v32n1/v32n1a6.pdf>

Torres, F., & Florez, L. (2009). *Cultivo de tomate de árbol bajo invernadero*. Asociación Colombiana Para El Avance de La Ciencia – ACAC.
https://www.researchgate.net/publication/318720755_CULTIVO_DE_TOMATE_DE_ARBO_L_BAJO_INVERNADERO_CONTRATO_DE_FINANCIAMIENTO_053_DE_2008

Viera, W., León, J., & Ochoa, J. (2002). Evaluación de fungicidas in vitro y pruebas de resistencia de cinco variedades de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) para antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Rumipamba*, 16(1), 88–91.
https://www.researchgate.net/publication/323705210_Evaluacion_de_fungicidas_in_vitro_y_pruebas_de_resistencia_de_cinco_variedades_de_tomate_de_arbol_Solanum_betaceum_Cav_para_antracnosis_Colletotrichum_gloeosporioides

Yáñez-Mendizábal, V., & 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(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2018.04.004>

Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2021). *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters* 2021 43:3, 43(3), 719–728. <https://doi.org/10.1007/S10529-020-03066-X>

Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., & Teixidó, N. (2011). Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology*, 21(4), 409–426.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>

Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Cañamás, T., & Teixidó, N. (2011). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol

agent *Bacillus subtilis* CPA-8. *Biotechnology Letters* 2011 34:4, 34(4), 729–735.

<https://doi.org/10.1007/S10529-011-0834-Y>

Enlace: https://drive.google.com/drive/folders/1660nxZ_Z6x77N3SuIY7W-iZnkqoXB6gW?usp=sharing