



Evaluación de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el crecimiento de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi

Proaño Grijalva, Brayhant Michael

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

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

Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D

15 de agosto de 2022



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: Evaluación de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* Ctpx\$2-1 y Ctpx\$3-5 sobre el crecimiento de arándano *Vaccinium myrtillus* var. *Biloxii* fue realizado por el señor Proaño Grijalva, Brayhant Michael; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 15 de agosto 2022



Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D

C.C: 0601558459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Yo, Proaño Grijalva, Brayhant Michael, con cédula No 1723949069, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el crecimiento de arándano *Vaccinium myrtillus* var. *Biloxi*** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 15 de agosto 2022

Proaño Grijalva, Brayhant Michael

C.C: 1723949069



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Autorización de Publicación

Yo, **Proaño Grijalva Brayhant Michael**, con cédula de ciudadanía No. **1723949069**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el crecimiento de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de responsabilidad.

Sangolquí, 15 de agosto 2022

Proaño Grijalva, Brayhant Michael

C.C: 1723949069

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

Proaño_Brayhant_CFS.docx
Scanned on: 17:7 August 15, 2022 UTC



Identical Words	291
Words with Minor Changes	133
Paraphrased Words	370
Omitted Words	1803



CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

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

Dedicatoria

Dedico con todo mi corazón a Dios y la Virgen Dolorosa, por ser mi guía durante todo mi proceso de formación en la carrera.

A mi madre, Lucia Grijalva por ser la persona que me inspiro y estuvo pendiente con sus consejos durante toda mi vida estudiantil.

A mi abuelo, Jorge Grijalva a pesar de que no se encuentra en vida, por ser la persona que me enseñó los valores más importantes y que fue mi ejemplo a seguir.

A mi hermana, Valentina Proaño quien se convirtió en mi compañía durante todo mi proceso de formación.

A mi padre, Edison Proaño por enseñarme el trabajo duro y la perseverancia para cumplir con la meta.

Brayhant Michael Proaño Grijalva

Agradecimientos

Agradezco principalmente al Dr. Cesar Falconi y Dr. Viviana Yáñez por brindarme la oportunidad de trabajar en sus investigaciones y aportarme con su amplia experiencia. Siempre tendrán mi gratitud y apoyo.

Agradezco a mis compañeros de investigación Darío, Diego, Daniela y Karina, por brindarme su apoyo, conocimiento y amistad durante el proceso de realización del presente trabajo.

A la Doc. Elizabeth Urbano, por brindarme su entera confianza y apoyo durante todo mi proceso de formación profesional.

A los docentes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria que han contribuido con su experiencia y conocimiento en mi formación como profesional.

Brayhant Michael Proaño Grijalva

Índice de Contenidos

Carátula	1
Certificación	2
Responsabilidad de Autoría	3
Autorización de Publicación	4
Resultados de la herramienta para la verificación y/o análisis de similitud de contenidos	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras	12
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo 1	15
Introducción	15
Antecedentes.....	15
Justificación	16
Objetivos.....	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
Hipótesis	17
Capitulo II.....	18
Revisión Literatura	18
Generalidades Arándano	18
Arándano en Ecuador	19
Características del cultivo	19

Hojas.....	19
Flores.....	20
Fruto	20
Raíz	20
Condiciones edafoclimáticas.....	20
Suelo.....	20
Clima.....	20
Agua	21
Control de malezas	21
Manejo de poda	21
Plagas y Enfermedades.....	22
Plagas.....	22
Frankliniella occidentalis	22
Arañita roja (Tetranychus urticae)	23
Enfermedades	23
Pudrición radicular (Phytophthora cinnamomi)	23
Alternaria sp.	23
Oidium.....	23
<i>Bacillus subtilis</i> rizobacteria promotora del crecimiento de plantas	24
Colonización de raíces.....	25
Biopelículas de <i>B. subtilis</i>	26
<i>B. subtilis</i> contribuye a la asimilación de nutrientes.....	27
Medios de bajo coste	28
Capítulo III.....	30
Metodología	30
Diseño Experimental.....	30

Ubicación del área de investigación	31
Preparación de medios de cultivo y diluciones para inóculos	32
Cuantificación de placas	33
Células y sobrenadantes de <i>Bacillus subtilis</i>	33
Concentración bacteriana	33
Ensayo por Espectrofotometría.....	33
Inoculación células y sobrenadantes de <i>B. subtilis</i> CtpxS2 y CtpxS3-5.....	34
Índice de clorofila, altura de planta, peso fresco y seco.	34
Variables a evaluar	34
Altura de plantas	34
Colonización de raíces	34
Porcentaje de humedad	34
Dinámica poblacional <i>Bacillus subtilis</i>	35
Índice del contenido de clorofila	35
Análisis Estadístico	35
Capitulo IV	37
Resultados y Discusión.....	37
Capitulo V	49
Conclusiones y Recomendaciones	49
Bibliografía.....	51

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Tratamientos y niveles de los factores</i>	36
Tabla 2 <i>Análisis de la varianza para el contenido de clorofila de plantas de arándano</i>	37
Tabla 3 <i>Media \pm desviación estándar del contenido de clorofila de plantas de arándano</i>	38
Tabla 4 <i>Análisis de la varianza para la altura de plantas de arándano</i>	39
Tabla 5 <i>Media \pm desviación estándar de la altura de plantas de arándano</i>	39
Tabla 6 <i>Análisis de la varianza para el peso seco de plantas de arándano</i>	41
Tabla 7 <i>Media \pm desviación estándar de la altura de plantas de arándano</i>	41
Tabla 8 <i>Análisis de la varianza para el peso húmedo de plantas de arándano</i>	42
Tabla 9 <i>Media \pm desviación estándar del peso húmedo de plantas de arándano</i>	42

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema croquis experimental	31
Figura 2 Visión satelital área de estudio	32
Figura 3 Porcentaje de humedad hojas de plantas de arándano por efecto de inoculación con células sobrenadantes	44
Figura 4 Porcentaje de humedad tallos de plantas de arándano por efecto de inoculación con células sobrenadantes	44
Figura 5 Porcentaje de humedad raíz de plantas de arándano por efecto de inoculación con células sobrenadantes.	45
Figura 6 Dinámica poblacional células <i>B. Subtilis</i> S3-5	46
Figura 7 Dinámica poblacional células <i>B. Subtilis</i> S3-5	46

Resumen

El arándano, *Vaccinium myrtillus*, es un frutal de gran valor nutricional y con un excelente potencial económico. Sin embargo, no existe suficiente información en relación al manejo y aplicación de productos biológicos para su crecimiento. *B. subtilis* es una bacteria utilizada en diversos estudios para el control de enfermedades fungosas y también como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal por la producción de metabolitos primarios y secundarios. En el presente estudio se evaluó la respuesta de células y sobrenadantes de dos cepas de *B.subtilis* producidos en medios de bajo coste sobre el crecimiento del arándano. Para ello, se aisló mediante centrifugación células y sobrenadantes de *B.subtilis*. Seguidamente, se extrajo mediante filtración al vacío, sobrenadante puro y se determinó el crecimiento de la bacteria en el suelo mediante dinámica poblacional y en medio NYP (medio sin agar) por espectrofotometría. Finalmente, las inoculaciones se realizaron cada quince días inyectando al suelo. Los resultados determinaron que las células de *B.subtilis* S2-1 y S3-5 promulgaron el crecimiento de las plantas tratadas de arándano, además que las cepas desarrolladas en medios de bajo coste tuvieron una concentración de 2.66×10^{17} UFC/ml para S2-1 y 3.07×10^{17} UFC/ml para S3-5 en el tiempo. De esta manera, el estudio aporta nueva información acerca de la efectividad de *B.subtilis* como agente para promulgar el crecimiento y disminuir el estrés de la planta.

Palabras clave: Bacillus subtilis, células, sobrenadantes, crecimiento vegetal, dinámica poblacional

Abstract

The blueberry, *Vaccinium myrtillus*, is a fruit tree of great nutritional value and excellent economic potential. However, there is not enough information regarding the management and application of biological products for its growth. *B. subtilis* is a bacterium used in several studies for the control of fungal diseases and also as a rhizobacterium that promotes plant growth through the production of primary and secondary metabolites. In the present study, the response of cells and supernatants of two strains of *B. subtilis* produced on low-cost media on blueberry growth was evaluated. For this purpose, *B. subtilis* cells and supernatants were isolated by centrifugation. Then, pure supernatant was extracted by vacuum filtration and bacterial growth was determined in soil by population dynamics and in NYP medium (non-agar medium) by spectrophotometry. Finally, inoculations were performed every fifteen days by injecting into the soil. The results determined that *B. subtilis* S2-1 and S3-5 cells enacted the growth of the treated blueberry plants, furthermore, the strains developed on low-cost media had a concentration of 2.66×10^{17} CFU/ml for S2-1 and 3.07×10^{17} CFU/ml for S3-5 over time. Thus, the study provides new information about the effectiveness of *B. subtilis* as an agent to enact growth and decrease plant stress.

Keywords: *Bacillus subtilis*, cells, free cells, plant growth, population dynamics.

Capítulo 1

Introducción

Antecedentes

Los microorganismos se han convertido en una herramienta fundamental para la producción agrícola. Tienen la capacidad de promover la mejora y crecimiento de las plantas hasta el punto de ser comercializados como productos agrícolas.

Los microorganismos constituyen elementos importantes para el desarrollo fisiológico de las plantas. Pueden desarrollar el mismo papel de los fungicidas, pesticidas y fertilizantes químicos, actuando como biofertilizantes y biopesticidas. En diversos estudios se ha evidenciado que las bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) mejoran la disponibilidad de nutrientes, reducen el estrés abiótico, aumentan las defensas de las plantas y ayudan a combatir los patógenos.

Las rizobacterias pueden mejorar de manera significativa el crecimiento de las plantas mediante la inducción de resistencia sistemática, antibiosis, mejorar la tolerancia a cambios en el ambiente y preservar la salud del suelo (Alam et al., 2011). Gracias a sus características únicas y relación de las plantas, estas bacterias promotoras del crecimiento, puede implementarse en sistemas de producción agrícola sostenibles y beneficiosas con el medio ambiente (Zhao et al., 2011).

El uso excesivo de agroquímicos en la agricultura ha causado una significativa contaminación de los sistemas naturales y resistencia de ciertas enfermedades de interés agrícola. Por tanto, la aplicación y uso de productos biológicos como medios sustitutivos a los tradicionales, benefician el cuidado del medio ambiente, preservan recursos naturales y cuidan la salud humana.

Uno de los prometedores microorganismos para la agricultura sostenible es *Bacillus subtilis*, que ha sido reportado como un promotor del crecimiento y como antagonista de una variedad de patógenos *in vitro* y en estudios de campo e invernaderos. *B. subtilis* se presenta

como un endófito de las raíces de las plantas. Los mecanismos indirectos asociados con la actividad de biocontrol de *B. subtilis* contra patógenos vegetales incluyen la formación de biopelículas, la promoción del crecimiento vegetal, competencia por nutrientes, sitios de colonización, capacidad para inducir la lisis celular y la resistencia sistémica inducida (Lee et al., 2014).

Justificación

Diversos estudios en los cuales se ha utilizado diferentes cepas y poblaciones de *B. subtilis* han demostrado patrones de colonización en la superficie radicular y follaje de las plantas formando agregados o microcolonias (Wang et al., 2018). Alam et al. (2011) empleo *B. subtilis* en combinación con cuatro hongos micorrízicos arbusculares *Glomus aggregatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae* para evaluar la capacidad de aumentar la productividad del geranio. También se confirmó los efectos de *Bacillus spp*, como biofertilizantes en plantas para mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos en la fijación de nitrógeno, solubilización de fosforo y promover hormonas para el crecimiento vegetal (Posada Uribe, 2017).

La cepa E1R-j de *B. subtilis* colonizó endofíticamente las raíces y hojas de las plántulas de trigo y retrasó eficazmente la infección y colonización del hongo patógeno *Gaeumannomyces graminis var. tritici* en el tejido de la raíz (Bing et al., 2009). *B. subtilis* es capaz de producir fitohormonas por sí mismo, Blake et al. (2021) observaron que la inoculación con una cepa de *B. subtilis* productora de citoquinina condujo a una acumulación significativamente mayor de citoquinina en las plantas de lechuga, lo que resultó en un mejor crecimiento y rendimiento.

Estudios realizados por Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018) demostraron la capacidad antifúngica de *B. subtilis* contra patógenos como *Colletotrichum acutatum* en chocho y además el efecto de la bacteria para promover la síntesis de catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, estas son sustancias precursoras de la resistencia vegetal y así como promover 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 Mandizábal, 2012) será investigado en la promoción de crecimiento de arándano.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la respuesta de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi por efecto de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

Objetivos Específicos

Evaluar el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en un medio de bajo costo

Determinar el efecto de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre las características agronómicas (altura, índice de clorofila, biomasa) de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi

Determinar el efecto de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la colonización y crecimiento de raíces de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi cada 15 días.

Hipótesis

- H0: Células o sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no promueven el crecimiento de plantas de arándano.
- H1: Células o sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promueven el crecimiento de plantas de arándano.

Capítulo II

Revisión Literatura

Generalidades Arándano

Coville en 1908 realizó los primeros estudios en el proceso de domesticación del arándano o blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Coville visualizó un gran potencial en el arándano como cultivo y en sus aportes estableció por primera vez las condiciones del cultivo en relación a tipo de suelo, formas de propagación, polinización y mejoramiento genético. Es así que en los últimos tiempos el interés comercial por este cultivo se ha ido incrementando (Mainland, 2012).

En la actualidad, el cultivo de arándano se ha extendido de su lugar de origen (Estados Unidos) y está siendo cultivado en otras regiones del mundo: Europa, Sudamérica, Oceanía China y Japón. Debido a la gran dispersión mundial que ha tenido, este ha generado una gran cantidad de desafíos en lo que respecta a su adaptación y nuevos métodos de cultivo (Sosa, 2011). La amplia diversidad de la especie ha hecho posible que algunas variedades se adapten de mejor manera que otras, debido a que el cultivo ha tenido una amplia aceptación en el mercado. Se han iniciado programas de mejoramiento con el fin de aumentar la producción y mejorar la calidad del fruto bajo las propias condiciones de clima y suelos (Undurraga D. & Vargas S., 2013).

En el Ecuador, los procesos de establecimiento, manejo y fructificación para el cultivo de arándano no se ha desarrollado por la escasa información, por lo tanto no ha permitido establecer un adecuado sistema de producción del cultivo; el manejo agronómico incorrecto del cultivo en cada una de sus etapas de desarrollo ha ocasionado una disminución en el rendimiento (González et al., 2017), además de presentar problemas en el desarrollo vegetativo presentando arraigamiento por las limitaciones de la textura de suelo y profundidad que requiere el cultivo, también es de suma importancia el efecto de carácter fitopatógeno ocasionado por hongos, bacterias, virus y entre otros (Pescie et al., 2021).

Arándano en Ecuador

El arándano producido en el Ecuador tiene la ventaja de ser cultivado durante las 52 semanas en el año en comparación con países estacionales como Chile o Estados Unidos. Por lo cual pudo establecerse como un cultivo rentable por las condiciones agroclimáticas y por los precios de venta. Las horas luz que se tiene en el Ecuador permite influir en el diámetro de fruto, vida útil y grados BRIX.

En el Ecuador la producción del cultivo de arándano es favorable, debido a sus características edafoclimáticas:

- Veranos cálidos y secos (temperaturas mayores a 30 °C).
- Inviernos suaves (250 - 450 horas de frío)
- Mayores a 250 días sin heladas.

Las zonas con las condiciones adecuadas están orientadas en las regiones: costa y sierra, por presentar los días cálidos, con noches frías, por lo que la selección de la variedad *Biloxi* es la adecuada para la implementación del cultivo en Ecuador con:

- La planta es de hábito erecto, vigorosa y de buen rendimiento en la producción.
- Requiere un mínimo de 400 horas de frío.
- Permite una producción temprana.
- El fruto de mediano tamaño.
- Color azul claro, firme con buen sabor.

Características del cultivo

El arándano es un arbusto perenne, de estructura leñosa con ramificación basitónica. En su madurez puede alcanzar hasta los tres metros de altura. Produce nuevos tallos cada año, tiene una longevidad pudiendo llegar a 50 años.

Hojas

Las hojas son simples, alternas, de margen entero y caducas que se distribuyen por toda la ramilla. Alcanzan un tamaño de 1 a 8 cm largo y pueden tener forma ovalada o lanceolada.

Flores

Las flores pueden ser axilares o terminales, en racimos de 6 a 10 en cada yema. Las corolas contienen de 4 a 5 pétalos fusionados y pistilos entre 8 y 10 estambres.

Fruto

El fruto es una baya esférica que va de 1.5 cm a 0.7 cm de diámetro. Peso 0,5 a 4,0 g y varias semillas en su interior. Presenta diferentes colores como azules, negros y morados.

Raíz

Sistema radical superficial, se encuentra en el 80% del suelo en los primeros 40 a 20 cm. Conformada por raíces finas y fibrosas que se caracterizan por la ausencia de pelos absorbentes (Borda et al., 2011). Debido a su estructura radicular es sensible a suelos pesados, encharcado, por lo cual las raíces del arándano no tienen la capacidad de establecerse en suelos con mal drenaje.

Condiciones edafoclimáticas**Suelo**

El sistema radical del arándano se encuentra cercano a la superficie, aproximadamente a 50 cm de profundidad. Está conformado principalmente por raíces finas y fibrosas, debido a que estas raíces carecen de pelos radicales y poseen relativamente una baja capacidad de absorción (Lu et al., 2021). Es por esta característica que su estructura radicular no tiene la posibilidad de atravesar suelos compactos. El arándano requiere de suelos sueltos y bien drenados, con buen contenido de materia orgánica (González et al., 2017).

Clima

Generalmente, los arándanos se desarrollan en climas moderados, dependiendo de la especie, sus necesidades pueden variar entre 400 y 1200 horas frío con un umbral de 7 °C. Las plantas se vuelven muy sensibles a bajas temperaturas durante la fase de latencia, cuando en el medio se generan veranos nublados, la calidad de la fruta se ve afectada de manera negativa. En consecuencia, se reduce su producción y va a favorecer la presencia y

propagación de hongos; mientras que cuando en el medio se generan veranos muy calurosos, disminuye el sabor y la firmeza de la fruta (Lu et al., 2021).

Durante los primeros años de plantación, la presencia de vientos fuertes genera brotes caídos, afectando directamente a todo el proceso de floración, generando así una caída de flores, imposibilitando la polinización por insectos y teniendo en el producto final una baja *calidad de la fruta* (Undurraga D. & Vargas S., 2013).

Agua

Como se expuso anteriormente, las raíces de dicho cultivo son superficiales, fibrosas y de poca extensión. El arándano es muy sensible al déficit o al exceso de agua, por lo que se recomienda utilizar un sistema de riego localizado para obtener un nivel adecuado de humedad en los primeros 15 a 20 cm del suelo (Undurraga D. & Vargas S., 2013). Es importante tener en cuenta que el riego localizado es el principal sistema que se adapta a la condición radicular del cultivo, en consecuencia, la lámina de agua necesaria para los arándanos 2.46 l/ha, este valor dependerá del estado fisiológico de la planta (Leblanc et al., 2021).

Control de malezas

Las labores culturales contribuyen a impedir la competencia de malas hierbas con el cultivo de Arándano, de esta forma se evita que plantas con una estructura radicular prominente impidan el correcto crecimiento del cultivo y en consecuencia pérdida de rendimiento en la cosecha (Undurraga D. & Vargas S., 2013).

Manejo de poda

En los dos primeros años de plantación del arándano, es importante erradicar yemas florales con el fin de favorecer el desarrollo y crecimiento de brotes vegetativos. De manera general, en el cultivo del arándano se realizan dos tipos de poda: la poda de formación y la poda de producción, esta última consiste en eliminar todos los brotes que produjeron fruta la temporada anterior, eliminar brotes cruzados, ramas viejas, ramas improductivas y enfermas,

logrando así una apertura en la planta para dar acceso a la luz y la aireación (Mayorga Ramos, 2014)

Esta actividad no es unificada, ya que cada variedad será podada según sus características de crecimiento, desarrollo y producción. Se debe tener muy en cuenta que un exceso de poda provocará la presencia de un fruto de tamaño pequeño y de baja calidad; mientras que, si se realiza una poda suave, los brotes tenderán al envejecimiento, habrá pobre desarrollo de brotes y un exceso de fruta de bajo calibre. Teniendo en cuenta todo lo mencionado, es recomendable realizar una poda anual para lograr un desarrollo de brotes vigorosos y así mantener de manera equitativa la producción de follaje y fruta (Maticorena Quispe, 2017).

Plagas y Enfermedades

Una de las consideraciones a tomar en cuenta, es el establecimiento de un manejo integrado de plagas y enfermedades. Es necesario tener en cuenta que estructuras vivas atacan en cada etapa fenológica del cultivo, hospederos alternos dentro del ciclo de la plaga, sus formas de dispersión y cuál es la influencia de las condiciones climáticas para su incidencia para establecer las tecnologías adecuadas de manejo.

El arándano se adapta a una diversidad de climas, se han desarrollado variedades para cada zona, pero generalmente zonas con una acumulación de 400 a 1200 horas frío son los idóneos, cabe mencionar que los veranos soleados favorecen la calidad de fruta y evitan el desarrollo de hongos fitopatógenos.

Plagas

Frankliniella occidentalis

Ataca principalmente partes florales, impide la polinización y amarre del fruto. Se debe mantener el huerto libre de malezas o plantas hospederas. Las larvas y adultos son los estados que se alimentan de brotes tiernos y también tienen la capacidad de transportar enfermedades fúngicas (Undurraga D. & Vargas S., 2013).

Araña roja (Tetranychus urticae)

Esta plaga afecta a las estructuras vegetales como son hojas, brotes tiernos y frutos. Se encuentran principalmente en la parte superior de las hojas donde forman telas envolventes. El ataque en hojas causa clorosis. Los brotes atacados inhiben su crecimiento y el debilitamiento de la planta. Los monitoreos deben hacerse en previa floración y sobre brotes tiernos.

Enfermedades***Pudrición radicular (Phytophthora cinnamomi)***

Su ataque causa goma a la altura del cuello de la planta, se observan raíces con coloración negruzca. Los daños en la estructura de la planta ocasionan amarillamiento de nervaduras, lesiones en toda la planta. Necrosis en la base de la estaca y falta de desarrollo radicular y muerte. El patógeno tiene la posibilidad de producir esporas flageladas en suelos pesados e inundaciones. Se debe controlar el agua de riego y tener un buen drenaje.

Alternaria sp.

Presente cuando existe alta humedad, la temperatura ideal para su desarrollo se encuentra entre los 18 a 28°C. Se mide con un rango de escalas dependiendo del nivel en el que el hongo afecta las hojas. Reduce el área foliar, produce defoliación y disminuye la tasa de fotosíntesis de la planta. Se debe evitar riegos pesados, ventilar la zona de producción y aumentar el distanciamiento entre plantas (Undurraga D. & Vargas S., 2013).

Oidium

Las hojas muestran coloración plomiza que se intensifica en hojas superiores y se desprenden de manera fácil. Los tallos se convierten en estructuras frágiles. El *Oidium* producen una gran cantidad de esporas que son diseminadas por el viento y que pueden causar inoculación en sitios de la planta que tienen heridas profundas por efectos de poda.

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

Se han realizado diversos estudios en cuanto al uso de estructuras vivas en *Vaccinium corymbosum* L. Se puede emplear para procesos de reducción de presión de inóculo (*Trichoderma*, *Bacillus*, *Paecilomyces*), promover el crecimiento radicular (*Bacillus subtilis*), favorecer el desarrollo de microorganismos y solubilización de ciertos nutrientes del suelo para que se encuentren disponibles (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Arthrobotrys* y *Actinomicetos*) (Li et al., 2021).

Las bacterias con carácter endófito pueden concentrarse dentro de las estructuras de las plantas sin causar ningún daño. Ali et al. (2014), determinó que las bacterias promotoras de crecimiento (PGR) que comprenden 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa facilitan el crecimiento y desarrollo de plantas en situación de estrés.

Las bacterias del género *Bacillus* son de comportamiento anaerobio facultativo y Gram positivos. Se encuentran ampliamente distribuidos en suelo, aire y agua. Las especies de *Bacillus* son capaces de formar esporas resistentes al estrés de larga vida, de secretar metabolitos que estimulan el crecimiento de las plantas, previenen la infección por patógenos por tanto se usan en la elaboración de productos biotecnológicos (Lee et al., 2014).

B. subtilis es una bacteria que ha sido estudiada y empleada en la agricultura, ofrece beneficio a las plantas, una de ellas es exhibir un mecanismo de control biológico directo e indirecto para contrarrestar enfermedades causadas por patógenos. En relación al mecanismo directo, sintetiza metabolitos secundarios, hormonas y antioxidantes que ayudan a la planta en su defensa contra el ataque de patógenos. Además, mejora la tolerancia al estrés de las plantas a partir de la inducción de estructuras bioquímicas relacionadas con el estrés. El mecanismo indirecto incluye la estimulación del crecimiento de las plantas y la inducción de resistencia sistémica adquirida. *Bacillus subtilis* también puede solubilizar el P del suelo y mejorar la fijación de nitrógeno (Meena, 2018).

Las PGR inhibe la acción de patógenos por antibiosis. *B. subtilis* produce sustancias con propiedades antimicrobianas, lipopeptidos, exoenzimas y compuestos volátiles. Un lipopeptido está conformado por una cadena de ácido graso conformada por 13 a 15 carbonos y una cadena péptica. Los lipopeptidos tienen bajo nivel de toxicidad, alta biodegradabilidad, pueden ser agentes antitumorales, antivirales y tienen la capacidad de biodegradar hidrocarburos (Yang et al., 2006).

Los lipopeptidos estudiados por *Bacillus* por su capacidad antagonista contra fitopatógenos son: surfactinas, iturinas y fengicinas. En relación a las surfactinas, son estructuras compuestas por anillos heptapeptidicos unidos a un ácido graso β -hidroxi, formando una estructura de anillo lactona. Su cadena puede estar conformada por 13 a 15 carbonos. Las surfactinas tienen la capacidad de reducir la tensión superficial, inducen la resistencia sistémica y facilitan la proliferación de bacterias para colonizar la rizosfera (Falardeau et al., 2013). La familia de las iturinas, representada por la iturina A, la micosubtilina y la bacilomicina, son heptapéptidos con un ácido b-aminograso y exhiben una fuerte actividad antifúngica. Las iturinas son estructuras con la capacidad de suprimir el crecimiento de hongos (Saraf et al., 2014).

Finalmente, las fengicinas son estructuras conformadas por una cadena de ácido graso β -hidroxi unida a un decapeptido con ocho aminoácidos que forman parte un anillo lactona. Su cadena pueda estar conformada por 14 a 18 carbonos. Inhiben el crecimiento de los filamentos de los hongos, reducen la severidad de la enfermedad en la planta (Sánchez Pila, 2016).

Colonización de raíces

La rizosfera es una estructura abundante de nutrientes producto de la acumulación de exudados vegetales que contienen aminoácidos que proveen energía y nutrientes para las bacterias colonizadoras. La colonización de raíces por parte de microorganismos beneficiosos contribuyen al control efectivo de patógenos en el suelo (Tao et al., 2019).

B. subtilis contribuye en la asimilación de nutrientes gracias a la colonización que esta desarrolla en la planta huésped. Las plantas receptan compuestos bacterianos que estimulan su crecimiento y brindan protección contra el estrés a sus huéspedes. Para que se desarrolle la colonización de *B. subtilis* en la planta hospedera, es necesario que ocurra un proceso quimiotaxico con las bacterias de la rizosfera. La quimiotaxis es necesaria para que *B. subtilis* localice y colonice raíces jóvenes (Zhao et al., 2011).

La quimiotaxis es un proceso en el cual los exudados producidos por la planta generan una atracción y adherencia de los microorganismos a la raíz. En consecuencia, se forman biopelículas las cuales están conformadas por una comunidad bacteriana cubierta por una matriz auto-secretada. Adicionalmente la presencia de lipopéptidos se ha tomado cuenta dentro del proceso de colonización bacteriana, esto debido a la reducción de la tensión superficial en el medio, lo que facilita el transporte de los microorganismos y la formación de biopelículas bacterianas (Posada Uribe, 2017).

Los compuestos orgánicos liberados por las raíces de las plantas incluyen aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenólicos, reguladores del crecimiento de las plantas, poliaminas, esteroides, azúcares y vitaminas. La competencia por estos nutrientes y nichos es un mecanismo fundamental por el cual *B. subtilis* protege a las plantas de los fitopatógenos (Bing et al., 2009).

B. subtilis también participa en la colonización micorrízica de las raíces. La inoculación dual de un hongo micorrízico arbuscular y *B. subtilis* Daz26 fijadora de nitrógeno puede promover el crecimiento de las plantas, mejorar la colonización de micorrizas, aumentar la biomasa vegetal y la absorción de nutrientes del suelo.

Biopelículas de *B. subtilis*

Como se mencionó anteriormente, *B. subtilis* tienen la capacidad de formar biopelículas conformadas por grupos de células que se encuentran dentro de una matriz compuesta por

exopolisacáridos (carbohidratos – proteínas), la cual genera estructuras multicelulares (Lee et al., 2014).

Se ha demostrado que algunos tipos de compuestos orgánicos volátiles (COV) emitidos por la cepa *B. subtilis* (GB03) ayudan a las plantas a recuperarse del estrés (Tahir et al., 2017). Las especies de *Bacillus* también secretan exopolisacáridos y sideróforos que inhiben o detienen el movimiento de iones tóxicos y ayudan a mantener un equilibrio iónico, así como la absorción de agua por las raíces. Estos compuestos también inhiben las poblaciones microbianas patógenas (Chaves-López et al., 2015).

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

El género *Bacillus* spp, tiene como característica transformar las formas complejas de nutrientes esenciales tales como fósforo y nitrógeno, en una forma simple y asimilable para la absorción de las raíces de las plantas. La secreción de exudados como fosfatasas y ácidos orgánicos de *Bacillus* spp, facilita la conversión de fosfato inorgánico en fosfato libre a partir de la acidificación del entorno (Hashem et al., 2019). Las plantas aumentan la eficiencia de absorción de fósforo al mejorar la fosfatasa ácida, la cual es responsable de la solubilización de fósforo (Saeid et al., 2018).

En relación al nitrógeno, al ser un nutriente escaso en el suelo y estar presente en proteínas, ácidos nucleicos y compuestos orgánicos de plantas. *Bacillus* libera amoníaco de la materia orgánica nitrogenada y producen nitrogenasa que puede fijar nitrógeno atmosférico y proporcionarlo a las plantas para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas al retrasar la senescencia (Lee et al., 2014).

Las plantas aumentan la eficiencia de la adquisición de fósforo al mejorar la actividad de la fosfatasa ácida, una enzima que es responsable de la solubilización del fósforo, lo que aumenta significativamente la cantidad de exudación de ácido de la raíz.

Bacillus además contiene propiedades quelantes de hierro, a través de la producción de sideróforos. Los sideróforos son moléculas solubles que captan hierro para facilitar el

transporte de este elemento por parte de los microorganismos. Los sideróforos se unen al Fe^{3+} en sustancias complejas y reducen el Fe^{3+} a Fe^{2+} , que luego ingresa a las plantas (Tahir et al., 2017).

Estudios realizados por Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018), demuestran que los lipopeptidos de los aislamientos nativos de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 tuvieron un fuerte efecto inhibitor de *Colletotrichum acutatum* causa de la antracnosis del chocho. Posteriores estudios muestran que estos metabolitos secundarios promueven el crecimiento de brotes y raíces en plántulas de chocho (Yáñez-Mendizábal & Falconí, 2021).

Medios de bajo coste

Los medios de bajo coste se han empleado con la finalidad de reemplazar los medios convencionales para proliferar en gran cantidad agentes microbianos. La producción de agentes biológicos puede desarrollarse en las mismas condiciones, con mejores características y manteniendo la eficacia del organismo. Los medios de bajo coste deben satisfacer los requerimientos básicos para la producción de biomasa y metabolitos. Además, proveer energía para el mantenimiento de la biosíntesis y celular (Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

Ciertos productos de carácter industrial, pueden emplearse como suministros de fuentes de carbono y nitrógeno que permitan el crecimiento de agentes biológicos. La mayoría de bacterias puede asimilar fuentes orgánicas e inorgánicas. En el caso de *B. subtilis* se ha demostrado que estructuras simples y complejas de carbono (sacarosa o glucosa) influyen en el crecimiento celular y biosíntesis de antibióticos (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Las colonias de *Bacillus* son altamente resistentes a factores de estrés como lo son: sequia, fluctuaciones de temperatura y limitación de nutrientes, lo que hace fácil la formulación de *Bacillus*.

Los sustratos empleados como fuentes de nitrógeno pueden ser extracto de levadura, carne y proteínas y los más utilizados para la producción de *B. subtilis* son: concentrados proteicos de origen animal, melazas y subproductos de soya. Los concentrados proteicos son fuentes proteicas de gran aporte biológico y aminoácidos esenciales. Los medios constituidos

por melaza ofrecen fuentes de carbono, sustancias nitrogenadas y minerales como hierro, fosforo, potasio y magnesio. Finalmente, subproductos de soya son considerados para la producción de bacterias benéficas y metabolitos (Teixidó et al., 2011).

Capítulo III

Metodología

Diseño Experimental

Se evaluó la respuesta de 30 plantas de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi por efecto de células y sobrenadantes de dos cepas de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 bajo condiciones de invernadero (siembra directa y siembra en sustrato).

Se establecieron cuatro tratamientos (T1: seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi células de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1); (T2: seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi sobrenadante libre de células *B. subtilis* cepa CtpxS2-1); (T3: seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi células de *B. subtilis* cepa CtpxS3-5); (T4: seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi sobrenadante Libre de células *B. subtilis* cepa CtpxS3-5) y un testigo (T5: seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi agua destilada).

Se instalaron 5 rizotrones con dimensiones (1.0 m x 0,5 a x 0,4). Se colocaron seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi de un año de producción por rizotron.

Los tratamientos se establecieron en un Diseño Completamente al Azar con arreglo bifactorial 2x2 con tres repeticiones y un testigo. Se emplearon 15 unidades experimentales y se utilizaron 2 plantas como unidad muestral.

Donde los factores evaluados son:

Factor 1: Cepas de *Bacillus subtilis*

Nivel 1: *Bacillus subtilis* Ctpx2-1

Nivel 2: *Bacillus subtilis* Ctpx3-5

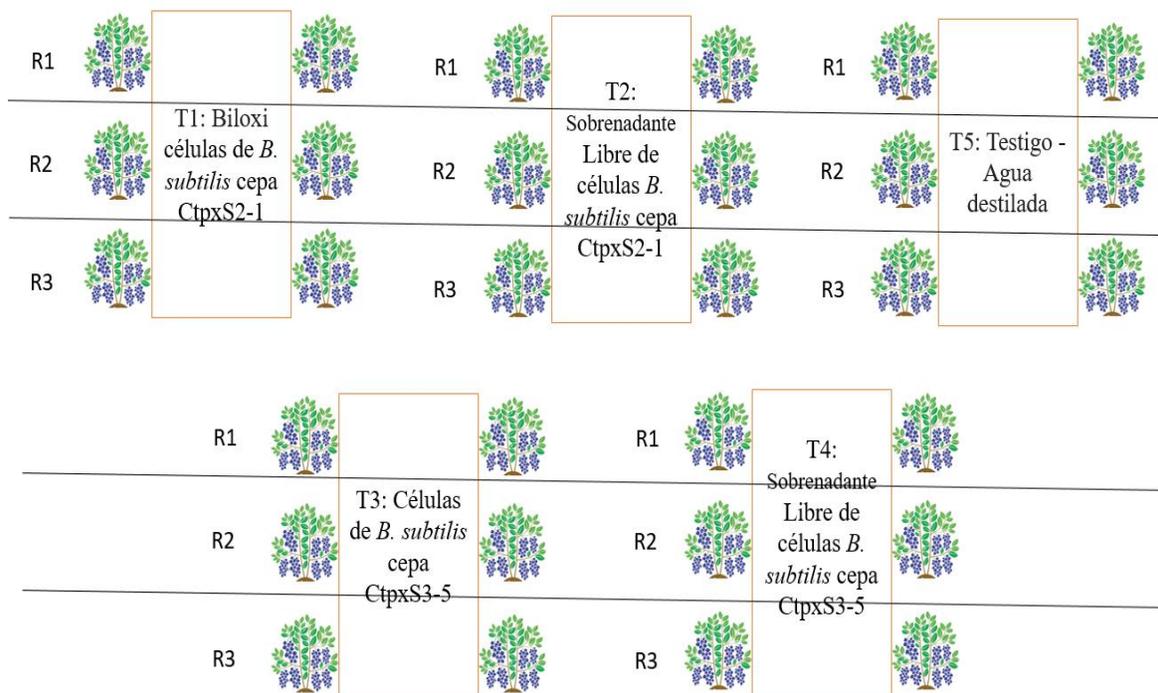
Factor 2: Tipo de inóculo

Nivel 1: Células de *Bacillus subtilis*

Nivel 2: Sobrenadante libre de células de *Bacillus subtilis*

Figura 1

Esquema croquis experimental



Nota: Grafico de autoría

Ubicación del área de investigación

El estudio se llevó a cabo en el área y laboratorios de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, hacienda “El Prado” (Figura 1), sector San Fernando, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha. Geográficamente ubicada a 78°24′44″ E, 0°23′20″ S y 2 748 m.s.n.m, piso altitudinal montano bajo, región altitudinal templada zona de vida: bosque húmedo montano bajo, clasificación bioclimática: húmedo temperado y piso zoogeográfico: temperado – alto andino, la temperatura media anual es 13,96 °C, y la precipitación anual de 1332 mm (Arce & Pozo, 2015).

Figura 2

Visión satelital área de estudio



Nota: Instalaciones IASA obtenido de (Google Maps, 2020)

Preparación de medios de cultivo y diluciones para inóculos

Para el desarrollo del experimento, se utilizaron medio agar nutritivo levadura dextrosa (NYDA), caldo nutritivo levadura dextrosa (NYDB), medio peptona sacarosa extracto de levadura y minerales (MOLP), solución amortiguadora fosfato (TP) y agua destilada.

El medio de bajo coste fue un medio líquido MOLP a base de $40 \frac{g}{L}$ de harina de soya, $5 \frac{g}{L}$ melaza y sales minerales, el cual puede mantener e incrementar la producción de compuestos de cepas de *B. subtilis* (Yáñez-Mendizábal et al. 2011). Además, se usó el medio NYDA ($8 \frac{g}{L}$ de caldo nutritivo, $5 \frac{g}{L}$ de extracto de levadura, $10 \frac{g}{L}$ dextrosa y $20 \frac{g}{L}$ de agar) para conteo y establecimiento de las concentraciones de inóculo.

Se prepararon bancos de dilución con 9 ml de solución buffer en tubos de ensayo. Para realizar la primera dilución 10^{-1} , se tomaron 90 ml de solución buffer en un Erlenmeyer de 500 ml y se añadió una muestra de 10 g de *B. subtilis* CtpxS2-1 o CtpxS3-5. Posteriormente, se realizaron las siguientes diluciones seriadas hasta obtener diluciones que satisfagan los

criterios de cuantificación de las poblaciones de *B. subtilis* tomando como referencia la dilución 10^{-8} .

Cuantificación de placas

Mediante plateo en medio NYDA, se cuantificaron las poblaciones viables de *B. subtilis* CtpxS2-1 o CtpxS3-5 y expresaron en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Para eso de cada dilución seriada se sembró alícuotas de 50 ul, rastrillado sobre el medio. Cada dilución se sembró por duplicado y se incubó durante 24 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se seleccionaron aquellas placas que tuvieron entre 30 y 300 colonias, se cuantificó y se multiplicó por el factor de corrección, 50, para completar el recuento a un mililitro y finalmente para el inverso de la dilución empleada. Se realizará dicho proceso cada 15 días (Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

Células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis*

Se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml, 45 ml de *B. subtilis* y se centrifugaron a 4000 RPM durante un periodo de 30 min para separar el sobrenadante de las células. Las repeticiones dependieron de la concentración en la cual se encontraba las muestras de Ctpx2-1 o Ctpx3-5, con tres repeticiones. Posteriormente, se utilizó el método de filtración al vacío o filtración por succión con filtros de $22 \mu\text{m}$ para obtener sobrenadante. Se verificó la calidad del producto obtenido mediante la siembra de $50 \mu\text{l}$ del sobrenadante en medio NYDA.

Concentración bacteriana

La suspensión bacteriana de *B. subtilis* se extrajo de las cajas incubadas durante 24 horas y se colocó en medio de cultivo líquido MOLP estéril. La concentración total bacteriana se determinó mediante recuento de células en la cámara de Neubauer o hematocitómetro.

Ensayo por Espectrofotometría

La turbidez de células sembradas en medio NYD fue evaluada mediante un ensayo de espectrofotometría con una longitud de onda calibrada a 700 nm en intervalos de 30 minutos

hasta completar 8 observaciones. Para realizar la curva de crecimiento en el tiempo se utilizó el software libre Combase.

Inoculación células y sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5.

La inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 se realizó al suelo de cada planta a una concentración de 1×10^9 UFC/ml, cada 15 días durante tres meses. Previo cada inoculación, se recolectaron con un barreno, muestras del 10 g del suelo para establecer la dinámica de la población en el suelo. El mismo procedimiento se realizó cada 15 días.

Índice de clorofila, altura de planta, peso fresco y seco.

Se cuantifico el índice de clorofila de tres hojas por cada planta con el medidor (CCM-200 plus chlorophyll content meter). Finalmente, cada 15 días se midió la altura de las plantas y en la culminación del ensayo se determinó el peso fresco y peso seco de cada unidad muestral.

Variables a evaluar

Altura de plantas

Se evaluó la altura de las plantas de *Vaccinium myrtillus* cada quince días, previo a la inoculación. Con un flexómetro se midió la altura de la planta desde la base hasta el meristemo apical de cada planta.

Colonización de raíces

Se recolectó 1g de raíces por cada unidad muestral y se realizó la misma metodología mencionada para dinámica poblacional.

Porcentaje de humedad

Se extrajeron las plantas de ambas condiciones de siembra, se separó las partes de hojas, tallos y raíces para ser pesadas y posteriormente colocadas a 72°C durante tres días. El peso fresco de hojas, raíces y tallos se determinó por el porcentaje de humedad de la planta de cada tratamiento al término de la fase de experimentación.

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

Donde P_i es el peso inicial o peso fresco de la plántula y P_f es el peso final o peso seco de la misma.

Dinámica poblacional *Bacillus subtilis*

Se evaluaron poblaciones cultivadas de cepas *CtpxS2-1* o *CtpxS3-5* de *Bacillus subtilis*, se recolectaron muestras de 10 g de suelo y se añadió 90 ml de solución buffer. Finalmente se realizaron diluciones seriadas para obtener una dilución cuantificada. Los datos colectados cada quince días nos ayudaron a construir una gráfica de la población viable en el tiempo.

Índice del contenido de clorofila

Para el índice del contenido de clorofila se realizaron lecturas de 3 hojas cada 15 días, con la ayuda del medidor de clorofila CCM-200 Chlorophyll Content Meter (opti-Sciences).

Superficie radicular

Se realizó una recopilación fotográfica del desarrollo radicular y se calculó mediante el software image J que determinó el área y longitud de la raíz.

Análisis Estadístico

Las variables altura, porcentaje de humedad, peso fresco y peso seco se analizaron mediante estadística descriptiva (media y desviación estándar). Para determinar el efecto de células y sobrenadantes de dos cepas de *B. subtilis* *Ctpx2-1* y *Ctpx3-5* sobre las variables. Se empleó el siguiente modelo matemático:

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

Donde:

Y_{ijk} = Variables de respuesta

μ = Media General

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

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

CM_{ij} = Efecto de la ij -ésima interacción de Cepa x células o sobrenadante

E_{ijk} = Error experimental

Los supuestos del análisis de varianza, fueron evaluados usando la prueba de Shapiro-Wilks y homocedasticidad. Además, para determinar el efecto de células y sobrenadantes de dos cepas de *Bacillus subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 sobre las variables mencionadas se realizó contrastes ortogonales. Donde los contrastes fueron definidos de la siguiente manera:

Contraste 1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

Contraste 2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

Contraste 3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

Contraste 4: Interacción Cepa x Inoculo

Todos los datos fueron procesados en el software estadístico INFOSTAT con un nivel de significancia del 5%.

Tabla 1

Tratamientos y niveles de los factores

Tratamiento	Cepas <i>B. subtilis</i>	Tipo de inoculación
T1	S3-5	Células
T2	S3-5	Sobrenadantes
T3	S2-1	Células
T4	S2-1	Sobrenadantes
Testigo	-	-

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Tabla 2

Análisis de la varianza para el contenido de clorofila de plantas de arándano

	15 DDT		30 DDT		45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT		
	gl	p valor		p valor		p valor		p valor		p valor		p valor		p valor	
TRATAMIENTOS	4	0.14	ns	0.25	ns	0.04	*	0,02	*	0,0002	*	<0,0001	*	<0,0001	*
CONTRASTES															
C1	1	---	---	---	---	0,52	ns	0,68	**	0,5672	ns	0,781	ns	0,4625	ns
C2	1	---	---	---	---	0,24	ns	0,37	**	0,0174	*	0,0094	*	0,147	ns
C3	1	---	---	---	---	0,07	*	0,01	*	<0,0001	*	<0,0001	*	<0,0001	*
C4	1	---	---	---	---	0,02	*	0,04	*	0,2454	ns	0,1437	ns	0,7782	ns
ERROR	25														
TOTAL	29														

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

* valores son significativos $P < 0,05$, ^{ns} valores no son significativos

Tabla 3*Media \pm desviación estándar del contenido de clorofila de plantas de arándano*

TRATAMIENTOS	45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT						
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE					
TESTIGO	12,772	\pm 2,1185	AB	17,527	\pm 0,6802	AB	19,977	\pm 2,0919	AB	20,862	\pm 3,4564	AB	22,923	\pm 6,3635	AB
CELULAS S2-1	17,048	\pm 3,374	A	20,753	\pm 4,7683	A	24,478	\pm 3,661	A	26,433	\pm 1,7738	A	30,453	\pm 3,3	A
SOBRENADANTE S2-1	11,755	\pm 2,967	B	14,297	\pm 2,9513	B	16,955	\pm 2,1776	B	20,317	\pm 5,019	B	15,005	\pm 4,8591	BC
CELULAS S3-5	12,55	\pm 1,3374	AB	16,65	\pm 1,5743	AB	20,04	\pm 2,4301	AB	24,528	\pm 2,0643	AB	26,433	\pm 7,0647	A
SOBRENADANTE S3-5	13,278	\pm 4,4154	AB	15,977	\pm 4,3723	AB	15,342	\pm 3,7249	B	14,003	\pm 4,4059	C	12,27	\pm 5,2795	C

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

Tabla 4*Análisis de la varianza para la altura de plantas de arándano*

	15 DDT		30 DDT		45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT		
	gl	p valor		p valor		p valor		p valor		p valor		p valor		p valor	
TRATAMIENTOS	4	0,081	ns	0,16	ns	0,0211	*	0,001	*	0,0002	*	<0,0001	*	<0,0001	*
CONTRASTES															
C1	1	---	---	---	---	0,35	ns	0,1169	ns	0,5672	ns	0,781	ns	0,4625	ns
C2	1	---	---	---	---	0,59	ns	0,7384	ns	0,0174	*	0,0094	*	0,147	ns
C3	1	---	---	---	---	0,0018	*	<0,0001	*	<0,0001	*	<0,0001	*	<0,0001	*
C4	1	---	---	---	---	0,4622	ns	0,6765	ns	0,2454	ns	0,1437	ns	0,7782	ns
ERROR	25														
TOTAL	29														

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

* valores son significativos $P < 0,05$, ns valores no son significativos

Tabla 5*Media \pm desviación estándar de la altura de plantas de arándano*

TRATAMIENTOS	45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT						
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE					
TESTIGO	12,772	\pm 2,1185	AB	17,527	\pm 0,6802	AB	19,977	\pm 2,0919	AB	20,862	\pm 3,4564	AB	22,923	\pm 6,3635	AB
CELULAS S2-1	17,048	\pm 3,374	A	20,753	\pm 4,7683	A	24,478	\pm 3,661	A	26,433	\pm 1,7738	A	30,453	\pm 3,3	A
SOBRENADANTE S2-1	11,755	\pm 2,967	B	14,297	\pm 2,9513	B	16,955	\pm 2,1776	B	20,317	\pm 5,019	B	15,005	\pm 4,8591	BC
CELULAS S3-5	12,55	\pm 1,3374	AB	16,65	\pm 1,5743	AB	20,04	\pm 2,4301	AB	24,528	\pm 2,0643	AB	26,433	\pm 7,0647	A
SOBRENADANTE S3-5	13,278	\pm 4,4154	AB	15,977	\pm 4,3723	AB	15,342	\pm 3,7249	B	14,003	\pm 4,4059	C	12,27	\pm 5,2795	C

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

Tabla 6

Análisis de la varianza para el peso seco de plantas de arándano

	Peso seco Hojas (g)			Peso seco Tallos (g)		Peso seco Raíz (g)	
	gl	p valor	*	p valor	*	p valor	*
TRATAMIENTOS	4	0,001	*	0,011	*	0,0001	*
CONTRASTES							
C1	1	0,17	ns	0,072	ns	0,148	ns
C2	1	0,315	ns	0,137	ns	0,822	ns
C3	1	0,0016	*	0,019	*	0,001	*
C4	1	0,366	ns	0,054	*	0,009	*
ERROR	25						
TOTAL	29						

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

* valores son significativos $P < 0,05$, ns valores no son significativos

Tabla 7

Media \pm desviación estándar del peso seco de plantas de arándano

TRATAMIENTOS	PESO SECO HOJA			PESO SECO TALLO			PESO SECO RAIZ		
	X	DE		X	DE		X	DE	
TESTIGO	1,89	\pm 0,69	B	1,83	\pm 0,59	B	3,25	\pm 0,46	BC
CELULAS S2-1	3,41	\pm 0,79	AB	3,84	\pm 1,7	A	4,17	\pm 0,74	AB
SOBRENADANTE S2-1	1,73	\pm 0,49	B	2,09	\pm 0,92	B	3,4	\pm 1,17	BC
CELULAS S3-5	4,66	\pm 3,31	A	2,45	\pm 0,37	AB	5,21	\pm 1,01	A
SOBRENADANTE S3-5	1,8	\pm 0,26	B	2,26	\pm 0,65	AB	2,51	\pm 0,6	C

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

Tabla 8*Análisis de la varianza para el peso húmedo de plantas de arándano*

	Peso húmedo Hojas (g)			Peso húmedo Tallos (g)			Peso húmedo Raíz (g)		
	gl	p valor		p valor		p valor			
TRATAMIENTOS	4	0,0129	*	0,0228	*	< 0,0001	*		
CONTRASTES									
C1	1	0,52	ns	0,153	ns	0,192	ns		
C2	1	0,275	ns	0,096	*	0,0032	*		
C3	1	0,0018	*	0,0308	*	< 0,0001	*		
C4	1	0,186	ns	0,079	*	0,776	ns		
ERROR	25								
TOTAL	29								

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

* valores son significativos $P < 0,05$, ns valores no son significativos

Tabla 9*Media \pm desviación estándar del peso húmedo de plantas de arándano*

TRATAMIENTOS	PESO HUMEDO HOJA			PESO HUMEDO TALLO			PESO HUMEDO RAIZ		
	X	DE		X	DE		X	DE	
TESTIGO	6,65	\pm 1,58	BC	3,98	\pm 1,29	C	15,27	\pm 3,12	BC
CELULAS S2-1	12,72	\pm 2,11	A	5,09	\pm 1,26	AB	25,02	\pm 3,67	A
SOBRENADANTE S2-1	5,16	\pm 2,01	C	4,58	\pm 1,58	AB	15,72	\pm 1,17	BC
CELULAS S3-5	8,67	\pm 2,26	AB	8,96	\pm 2,33	A	19,23	\pm 2,67	AB
SOBRENADANTE S3-5	4,77	\pm 0,99	C	4,47	\pm 1,21	AB	2,51	\pm 2,29	C

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

El análisis de la varianza y prueba de comparación de medias – Tukey al 5% para las variables de clorofila muestran en las Tabla 2 y 3, así como la altura de planta en las Tabla 4 y 5.

Si existieron diferencias significativas entre tratamientos durante los 105 días de aplicación (DDT) para el contenido de clorofila ($F_{4;25}=11.48$; $p<0,0001$). La interacción Cepa x Tipo de inóculo fue significativo desde los 45 días del tratamiento (DDT) ($F_{1;25}=5,92$; $p=0,02$). Finalmente, el tipo de inóculo fue significativo durante los 105 días de aplicación (DDT) ($F_{1;25}=0,56$; $p=0,4625$) (Tabla 2).

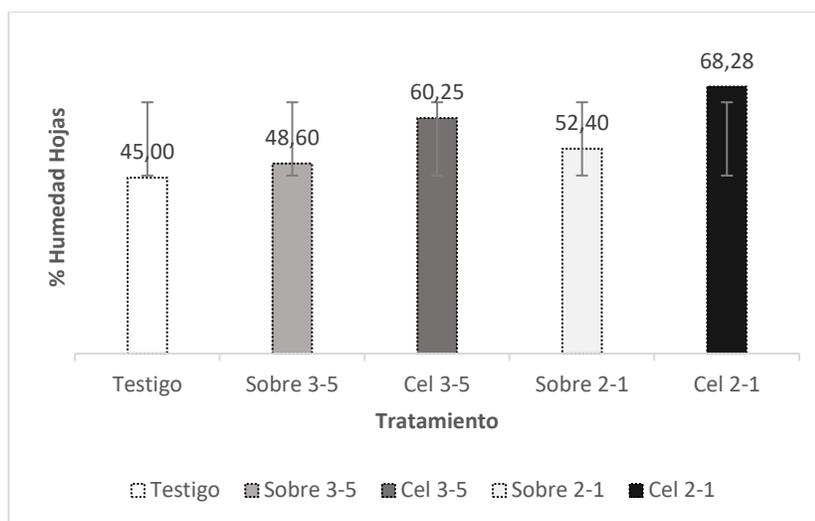
El contenido de clorofila de las plantas de arándano inoculadas con células de *B. subtilis* S2-1 y *B. subtilis* S3-5 fue mejor durante los 105 días de aplicación. Las plantas inoculadas con sobrenadantes de *B. subtilis* S3-5 desde los 90 hasta los 105 días presentaron el menor contenido de clorofila (Tabla 3).

Existieron diferencias significativas entre tratamientos y el testigo durante los 105 días de aplicación (DDT) ($F_{1;25}=4,62$; $p=0,014$). El tipo de inóculo fue significativo durante los 105 días de aplicación (DDT) para la variable altura ($F_{1;25}=27,84$; $p<0,0001$) (Tabla 4). La altura de las plantas de arándano inoculadas con células de *B. subtilis* S2-1 y *B. subtilis* S3-5 fue mejor desde los 45 días después del tratamiento hasta los 105 (DDT) (Tabla 5).

Existieron diferencias significativas entre tratamientos para el peso húmedo tallos ($F_{4;25}= 3,44$; $p< 0,001$), peso seco tallos ($F_{4;25}= 4,03$; $p< 0,001$), peso húmedo hojas ($F_{4;25}= 1,79$; $p< 0,001$), peso seco hojas ($F_{4;25}= 1,79$; $p< 0,001$), peso húmedo raíz ($F_{4;25}= 10,47$; $p<0,001$) y peso seco raíz ($F_{4;25}= 8,96$; $p< 0,001$). El tipo de inoculación fue significativo para peso seco y húmedo de raíz, tallo y hojas (Tabla 6). El peso fresco y seco de plantas inoculadas con células de *B. subtilis* de S3-5 y S2-1 fue mayor en comparación a los sobrenadantes y el testigo (Tabla 7 y 9).

Figura 3

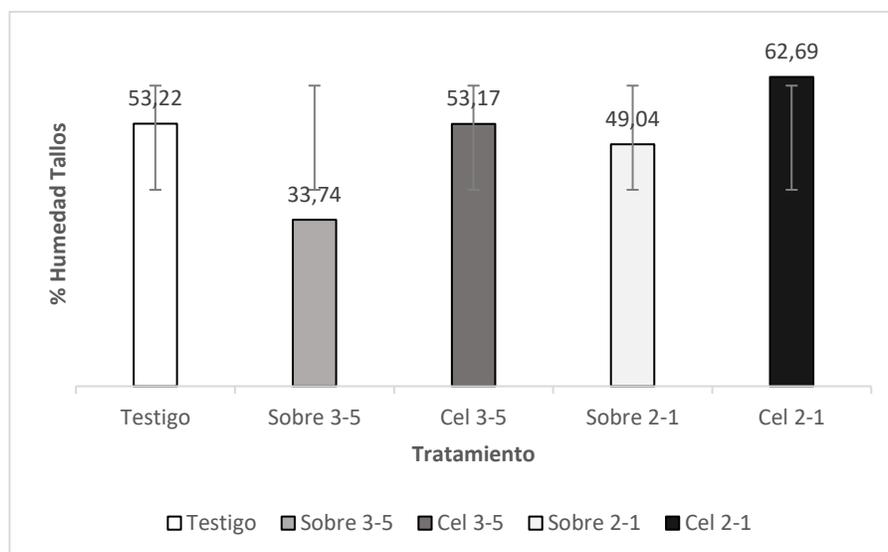
Porcentaje de humedad hojas de plantas de arándano por efecto de inoculación con células y sobrenadantes



Nota: Grafico de autoría

Figura 4

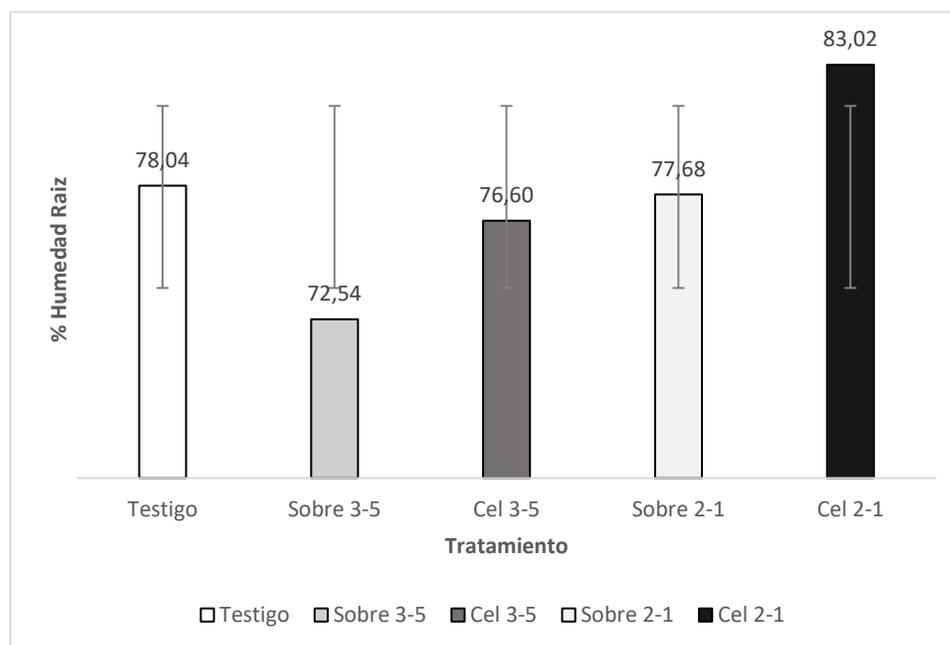
Porcentaje de humedad tallos de plantas de arándano por efecto de inoculación con células y sobrenadantes



Nota: Grafico de autoría

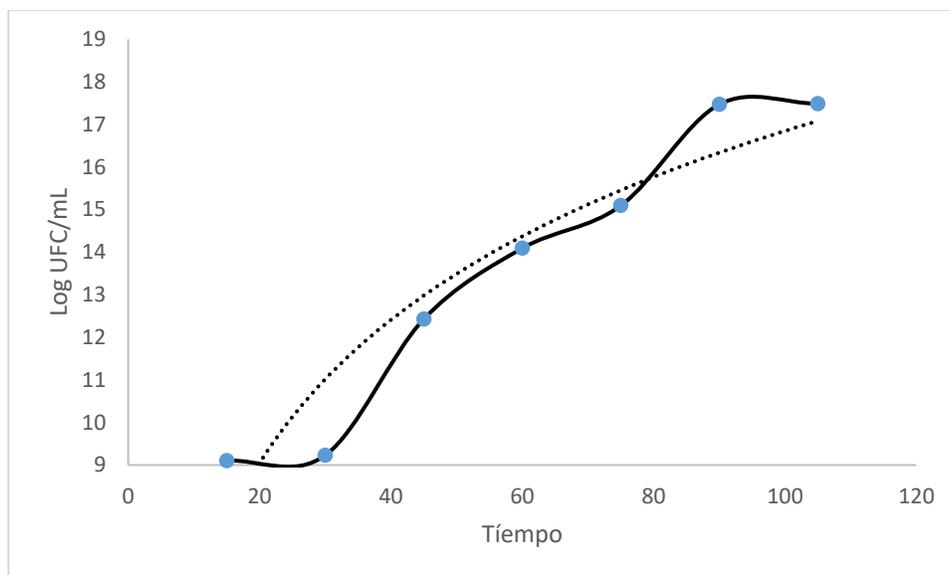
Figura 5

Porcentaje de humedad raíz de plantas de arándano por efecto de inoculación con células y sobrenadantes.

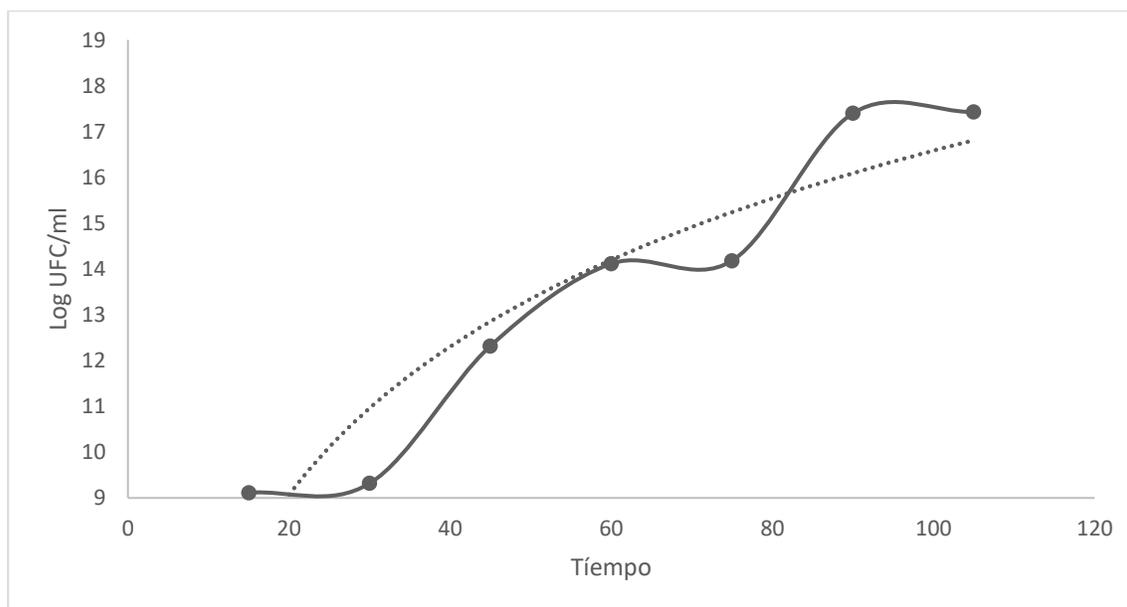


Nota: Grafico de autoría

El porcentaje de humedad de hojas fue mayor para plantas inoculadas con células *B. subtilis* S2-1 68,28% y *B. subtilis* S3-5 60,25% en comparación a las plantas inoculadas con sobrenadantes de *B. subtilis* S2-1 48,60%, *B. subtilis* S3-5 52,40% y el testigo 45,00% (Figura 3); el porcentaje de humedad para tallos fue mayor para plantas inoculadas con células *B. subtilis* S2-1 62,69% en comparación a los demás tratamientos. Las plantas tratadas con sobrenadantes de *B. subtilis* S3-5 fue menor 33,74% en comparación al testigo (Figura 4). Finalmente, el porcentaje de humedad de raíz fue mayor para las plantas inoculadas de células *B. subtilis* S2-1 83,02% en comparación a los demás tratamientos y el testigo (Figura 5).

Figura 6Dinámica poblacional células *B. Subtilis* S3-5

Nota: Grafico de autoría

Figura 7Dinámica poblacional células *B. Subtilis* S

Nota: Grafico de autoría

La cuantificación de células de *B. subtilis* S2-1 y S3-5, demostró que durante los primeros 30 días se mantuvo la concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ establecida al inicio del ensayo. Se observó un aumento progresivo de la concentración de *B. subtilis* S2-1 y S3-5 en el tiempo. A los 45 y 60 días la concentración alcanzó 10^{12} UFC mL⁻¹. Al final del estudio se reporta una concentración de 2.6×10^{17} de *B. subtilis* S2-1 UFC mL⁻¹ y 3.07×10^{17} UFC mL⁻¹ de *B. subtilis* S3-5 para células. Para sobrenadantes la concentración de *B. subtilis* S2-1 se encontró en 1.70×10^{14} UFC mL⁻¹ y 1.53×10^{14} UFC mL⁻¹ de *B. subtilis* S3-5.

La superficie y longitud radicular de las plantas empleadas en el ensayo no obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en comparación con el testigo. Esto pudo suceder a factores externos como el tipo de suelo en el cual fue sembrado y condiciones del invernadero. Además, el tipo de raíz que tiene el arándano es de carácter superficial y conformada por raicillas finas.

B. subtilis ha sido reportado como una bacteria cuyas características han beneficiado el buen crecimiento y desarrollo fisiológico de las plantas. Además, ofrecen la capacidad de las mismas a defenderse de la acción de enfermedades y patógenos. Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018), reportaron en plántulas de chocho tratadas con *B. Subtilis* S2-1 obtuvieron los valores más altos de proteína y clorofila, además establecieron que los lipopeptidos tienen la misma capacidad de reducir enfermedades causadas por hongos. En el estudio realizado, las plantas de arándano tratadas con células de *B. subtilis* S2-1 obtuvieron el mayor contenido de clorofila y las plantas tratadas con sobrenadantes de *B. subtilis* S2-1 soportaron el estrés causado por las condiciones del invernadero en las que fueron plantadas, por lo cual su nivel de clorofila fue el más bajo (Tabla 5).

B. subtilis es una bacteria con la capacidad de establecerse, crecer y multiplicarse de manera rápida en el tiempo. Los metabolitos primarios encargadas del crecimiento son sintetizadas durante la fase exponencial, mientras que los metabolitos secundarios se desarrollan en la fase estacionaria. Castañeda & Sánchez (2016) reportaron que la fase de

latencia de la bacteria es de 4 horas y de replicación de 5 horas posterior a la primera fase. De la misma manera Yáñez-Mendizábal et al (2011), reportaron una fase de latencia de 5 horas después de la cual se produjo un crecimiento exponencial alcanzando una población máxima de 3×10^9 UFC ml⁻¹. Esto concuerda con la información obtenida de las dos Cepas S2-1 Y S3-5, las cuales se establecieron en el suelo a una concentración inicial de 1×10^8 UFC mL⁻¹ y se mantuvieron durante los primeros 30 días del ensayo, posteriormente la concentración de ambas cepas fue aumentando en el tiempo hasta los 105 días del estudio donde se reporta una concentración de 2.66×10^{17} UFC/ml para S2-1 y 3.07×10^{17} UFC/ml para S3-5.

Células y sobrenadantes de *B. subtilis* promueven el crecimiento de plantas de arándano, sin embargo, el desarrollo de plantas tratadas con células aumenta en mayor grado. Los pesos frescos y secos de hojas, tallos y raíz reflejaron los efectos de *B. subtilis*, en las plantas de arándano. Los porcentajes de humedad de plantas tratadas con células de *B. subtilis*, estuvieron por encima del 60%. Tao et al. (2019), determinaron en plantas de pimiento, un aumento en el número de hojas, número de brotes y área foliar. Además, los pesos frescos y secos del tallo de pimiento fueron mayores al usar *Bacillus subtilis* SL-13-t, esto puede ser por la producción de varias fitohormonas como auxinas, AIA y elementos de defensa como lipoproteínas y biopolímeros. Sánchez Pila (2016), menciona que las endosporas de la bacteria inhiben los patógenos del suelo por lo cual mejoran significativamente el crecimiento de las plantas.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- La capacidad de producción de metabolitos primarios y secundarios de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 influyeron en el crecimiento y adaptación a condiciones de estrés del cultivo de arándano.
- El comportamiento de *B. subtilis* en el tiempo determinó un crecimiento de tipo logístico donde se inició con una concentración inicial de 1×10^9 UFC/mL para ambas cepas y hasta el término del ensayo con una concentración de 2.66×10^{17} UFC/ml para S2-1 y 3.07×10^{17} UFC/ml para S3-5.
- Se concluye la efectividad de inoculación en campo de células de *B. subtilis* en comparación a los sobrenadantes. Los mejores rendimientos en altura, índice de clorofila, peso seco, peso fresco y humedad se obtuvieron con células de *B. subtilis* independiente del tipo de cepa empleada.
- *B. subtilis* colonizó la rizosfera de las plantas, las concentraciones en el tiempo determinaron un cambio en la población en el suelo, sin embargo, el tipo de raíz de la planta no permitió evidenciar la interacción entre la estructura radicular y la bacteria.

Recomendaciones

- El arándano es un cultivo de gran interés comercial en el último tiempo por lo cual se puede realizar estudios complementarios, uno de ellos aislar los microorganismos que se encuentran en la estructura radicular de la planta.
- El uso de *B. subtilis* en el suelo es recomendable aplicarlo de manera conjunta con otros microorganismos con la finalidad de establecer la interacción y el modo de acción de los mismos en beneficio de los cultivos.

- Se recomienda realizar una nueva evaluación con los mismos factores empleados, ofreciendo a la planta el sustrato y pH ideal para su desarrollo.

Bibliografía

- Alam, M., Khaliq, A., Sattar, A., Shukla, R. S., Anwar, M., & Dharni, S. (2011). Synergistic effect of arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus subtilis* on the biomass and essential oil yield of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*). *Archives of Agronomy and Soil Science*, *57*(8), 889–898.
<https://doi.org/10.1080/03650340.2010.498013>
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, *80*, 160–167.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.003>
- Arce, M., & Pozo, W. (2015). *Vista de Variabilidad en la producción lechera del agrosistema IASA, según las categorías de intensidad de lluvias de Trojer*.
<https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/revista-serie-zoologica/article/view/1462/1047>
- Bing, L., HongPing, Q., Lili, H., Buchenauer, H., QingMei, H., ZhenSheng, K., & YuFei, G. (2009). Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, *49*(3), 277–285.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.007>
- Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *34*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Borda, M., Pescie, M., López, C., & Fedysak, P. (2011). Efecto del momento y tipo de poda sobre el rendimiento y calidad del fruto en arándano altos del sur (*Vaccinium corymbosum*) var. O'Neal en la provincia de Buenos Aires. *RIA. Revista de*

Investigaciones Agropecuarias, 37(3), 268–274.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86421245012>

Castañeda Alvarez E, & Sánchez L. (2016). *Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género Bacillus sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre Fusarium sp.* http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702016000200006&script=sci_abstract&tIng=es

Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Stellarini, A., Corsetti, A., & Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 487–499. <https://doi.org/10.1111/jam.12847>

Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>

González, A., Riquelme, J., & Morales, C. G. (2017). *Manual de manejo agronómico del arándano*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).

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>

Lee, S.-W., Lee, S.-H., Balaraju, K., Park, K.-S., Nam, K.-W., Park, J.-W., & Park, K. (2014). Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21-1 under two different soil conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6), 1353–1362.

- Li, Q., Yu, P., Lai, J., & Gu, M. (2021). Micropropagation of the potential blueberry rootstock—*Vaccinium arboreum* through axillary shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, 280. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.109908>
- Lu, Y., Ma, D., He, X., Wang, F., Wu, J., Liu, Y., Jiao, J., & Deng, J. (2021). *Bacillus subtilis* KLBC BS6 induces resistance and defence-related response against *Botrytis cinerea* in blueberry fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 114. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2020.101599>
- Mainland, C. M. (2012). Frederick V. Coville and the History of North American Highbush Blueberry Culture. <https://doi.org/10.1080/15538362.2011.619117>, 12(1–3), 4–13. <https://doi.org/10.1080/15538362.2011.619117>
- Maticorena Quispe, M. F. (2017). *Cinco tipos de poda en arándano (Vaccinium corymbosum L. cv. Biloxi) y su influencia en determinados parámetros productivos*.
- Mayorga Ramos, L. C. (2014). *Manejo integrado de podas de cultivo de arándano (Vaccinium corymbosum L.)*.
- Meena, V. S. (2018). *Role of Rhizospheric microbes in soil*. Springer.
- Pescie, M. A., Fradkin, M., Lavado, R. S., & Chiochio, V. M. (2021). Endophytic fungi in blueberry cultivars, in three production areas of Argentina. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2021.101662>
- Posada Uribe, L. F. (2017). Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico. *Escuela de Biociencias*.
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *Molecules*, 23(11), 2897. <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>

- Sánchez Pila, F. E. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Bionatura*, 1(3).
<https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.03.7>
- Saraf, M., Pandya, U., & Thakkar, A. (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*, 169(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.009>
- Sosa. (2011). *Repositorio Digital de la Universidad Fasta: Información, aceptabilidad y beneficios nutricionales en relación al consumo de dulce compacto de arándano y naranja*. <http://redi.ufasta.edu.ar:8082/jspui/handle/123456789/3337>
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. v, & Gao, X. (2017). Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 171.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>
- Tao, S., Wu, Z., Wei, M., Liu, X., He, Y., & Ye, B.-C. (2019). *Bacillus subtilis* SL-13 biochar formulation promotes pepper plant growth and soil improvement. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(5), 333–342. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0333>
- Teixidó, Torres, R., Viñas, I., M.Abadias, & Usall, J. (2011). 15 - Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. In C. Lacroix (Ed.), *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (pp. 364–402). Woodhead Publishing.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845696696500157>
- Undurraga D., P., & Vargas S., S. (2013). *Manual del arándano*.
<https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/7627>
- Wang, X. Q., Zhao, D. L., Shen, L. L., Jing, C. L., & Zhang, C. S. (2018). Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In *Role of rhizospheric microbes in soil* (pp. 225–250). Springer.

- Yáñez Mandizábal, V. del R. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta.*
files/14/Tvrym1de1.pdf
- 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, 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*, 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., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280–289.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Yang, S.-Z., Wei, D.-Z., & Mu, B.-Z. (2006). Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 68(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.03.008>
- Zhao, Q., Shen, Q., Ran, W., Xiao, T., Xu, D., & Xu, Y. (2011). Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 47, 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0558-0>

Enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/1cYTdPv0oREXKRHQ8pS8C01sTt_21qrd?usp=sharing