



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Evaluación de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de explantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro*

Heredia Cuichán, Darío Alexander

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 PhD.

27 de enero del 2023



Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) han sido utilizadas en diferentes investigaciones por su eficiencia en el desarrollo de las plantas y en el crecimiento de raíces, especialmente, en la fase de aclimatación de plántulas *in vitro*, lo que conduce a una mayor productividad y calidad de las plántulas



Las PGPR se caracterizan también por la producción de fitohormonas, especialmente auxinas que promueven el enraizamiento y el crecimiento vegetal.

Cepa SC20

Pseudomonas putida G2-8 y G11-32

Consorcio Bac109 y BP323EB

(Leite *et al.* (2021); Mirza *et al.* (2001))



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

La propagación *in vitro* es una técnica biotecnológica que ayuda a la preservación y mejoramiento de especies vegetales, porque permite su propagación masiva, indistintamente de su capacidad para reproducirse de manera natural. Este método requiere de medios complejos y requisitos hormonales exactos, además de la adición de sustancias químicas para evitar contaminación de hongos y bacterias en el medio de cultivo.

El arándano representa a nivel mundial un cultivo de importancia por su gran valor nutricional y cada año aumenta su área de producción, sin embargo, al tener un tallo leñoso tiene dificultades en la propagación *in vitro*, el principal problema de las plantas leñosas en la propagación *in vitro* se presenta en la etapa de enraizamiento y en el proceso de desinfección.

Los sobrenadantes de las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) representan una gran alternativa en la preparación de medios para el cultivo *in vitro*, por la producción de hormonas vegetales y otros metabolitos útiles para el desarrollo de los explantes. La bacteria *Bacillus subtilis* es una PGPR que produce auxinas, citoquininas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de sobrenadantes de dos cepas de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento de microexplantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) var. Biloxi en condiciones *in vitro*

Objetivos específicos

Determinar el efecto de las auxinas provenientes del sobrenadante de dos cepas de *B. subtilis* sobre explantes de arándano.

Verificar el efecto antifúngico y antibiótico del sobrenadante de *B. subtilis* en el medio de cultivo y microexplantes de arándano.

Cuantificar el porcentaje de oxidación de los microexplantes de arándano expuestos al sobrenadante de *B. subtilis* en condiciones *in vitro*.



Hipótesis

H0= Sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecido en medio de bajo coste no tienen efecto sobre el crecimiento, resistencia a enfermedades y mortalidad de explantes de arándano (*Vaccinium myrtillus*) en condiciones *in vitro*.

H1=Sobrenadantes de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 crecido en medio de bajo coste tienen efecto sobre el crecimiento, resistencia a enfermedades y mortalidad de explantes arándano (*Vaccinium myrtillus*) en condiciones *in vitro*.



Arándano

El género *Vaccinium* está constituido por alrededor de 450 especies, una gran parte de estas especies están distribuidas en las laderas montañosas de los trópicos, pero también se encuentran en climas subtropicales, templados y boreales del hemisferio norte.



En el Ecuador también se ha promovido el cultivo de esta baya, con diversos proyectos como el de introducción del cultivo de arándanos Biloxi y Emerald, en enero del 2019, en el que se sembraron más de seiscientas plantas de cada variedad tanto a campo abierto y bajo invernadero



Micropropagación del arándano



La propagación vegetativa del arándano, es la más común desde un enfoque comercial, ya que se garantiza la uniformidad del cultivo y las características propias del mismo, además de conseguir una planta libre de patógenos

Además del medio se hace uso de fitohormonas como las citoquininas, 6-(y,y-dimetilalilamino)-purina (2-isopenteniladenina) (2iP) y zeatina, estas sustancias ayudan a que la proliferación se acelere.

Temperatura: 20-25°C

Luz: 16 h de 10-75 mol/m²/s.

pH: 5.2



Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR)

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

Bacillus subtilis

También *B. subtilis* tiene la capacidad de producir ácido indolacético y solubilizar el fosfato.

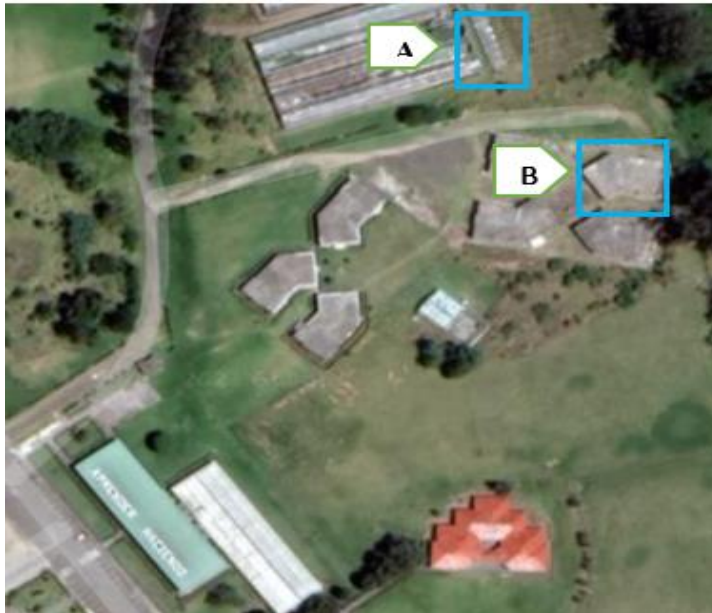
B. subtilis tiene propiedades antifúngicas y antibióticas, lipopéptidos antifúngicos, fengicina, iturina y surfactina lo que determina su capacidad de control biológico.

B. subtilis es una PGPR caracterizada por producir metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos. Se ha determinado que todas las cepas de *B. subtilis* tienen un efecto promotor de crecimiento,



Ubicación geográfica del lugar de investigación

Figura 1. *Visión satelital del área de estudio*



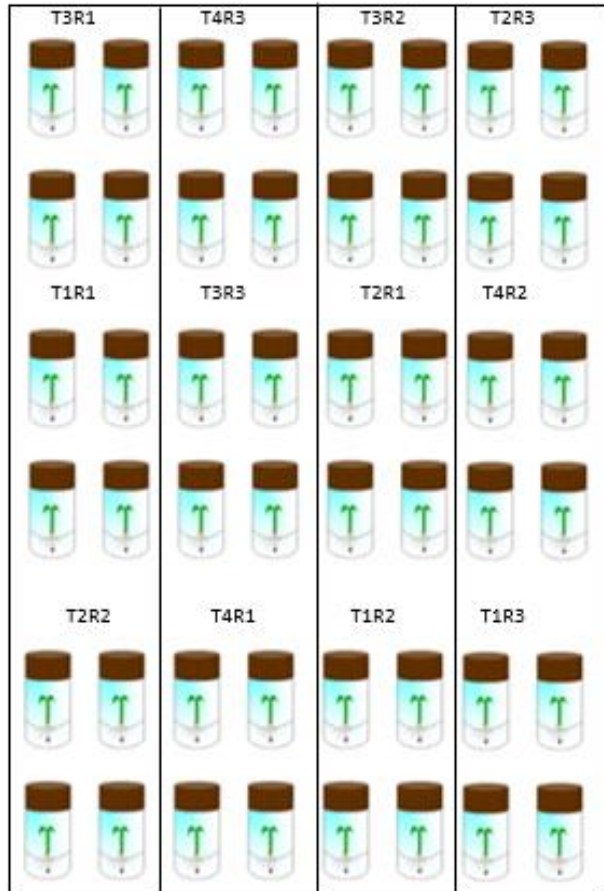
Nota: A) Invernadero de Fitopatología, B) Laboratorio de Fitopatología (Google Maps, 2022)

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

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

Diseño experimental

Figura 7. Croquis del Diseño experimental



Se estableció un DCA con 3 tratamientos y un testigo, se emplearon 12 unidades experimentales con tres repeticiones y cuatro explantes (muestras) como unidad muestral.

Tabla 2. Distribución del experimento para etapa de introducción

T1	12 explantes, sin auxinas.
T2	12 explantes, con 0,57 μ M de auxinas comerciales.
T3	12 explantes, con 0,57 μ M de auxinas provenientes del sobrenadante CtpxS2-1
T4	12 explantes, con 0,57 μ M de auxinas provenientes del sobrenadante de CtpxS3-5

Nota. Distribución del experimento con cada uno de los tratamientos con auxinas y sobrenadantes.

Autoría propia.

Preparación de medios de cultivo
Cultivo de células y sobrenadante.



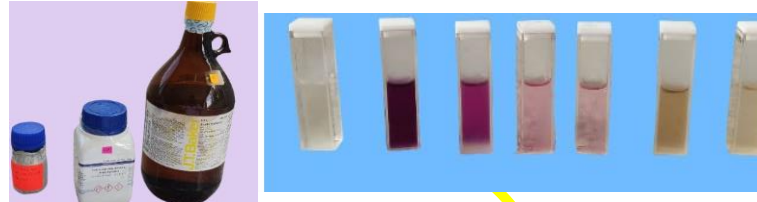
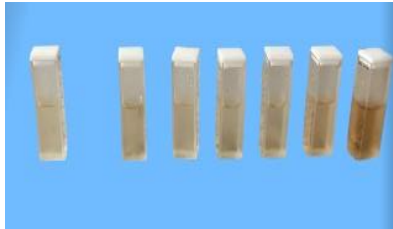
Extracción de sobrenadantes. Con la centrifugadora. (600rpm-15min)



Filtro de jeringa



Medición de auxinas



- Dilución de AIA comercial
- Preparación de reactivo Salkowski

Curva de Calibración

Incubación de muestras

- Las diluciones de AIA+ reactivo Salkowski-30min

- Las celdas con las muestras incubadas se leyeron en el espectrofotómetro

Lectura de muestras

Cantidad de AIA en los sobrenadantes.

- Los sobr. filtrados +reactivo Salkowski-30min
- Lectura espetofotometro

Concentración (ppm)
0
5
10
15
20
25
30
35



Preparación del medio de cultivo



Pesado de los reactivos

- Se peso los reactivos siguiendo el protocolo

- Frascos e instrumentos se esterilizaron

Esterilización del material

- Adición de las hormonas y sobrenadantes en el medio

- Con filtro de 0,22 micras
- Dispensar del medio en los frascos según los tratamientos.

- Pesado de hormonas AIA.
- Disolución en alcohol.
- Calculo de concentración ($C1.V1=C2.V2$)

Preparación de fitohormonas



Desinfección y siembra de explantes

- Rama principal y brotes secundarios
- 3-5mm de diámetro
- 2,5cm de longitud

Corte de los microexplantes en invernadero

Desinfección

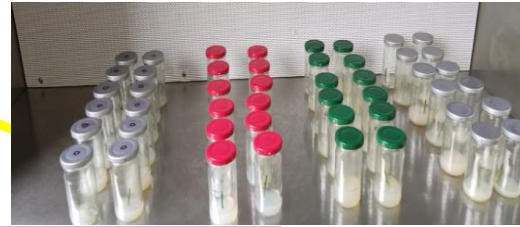
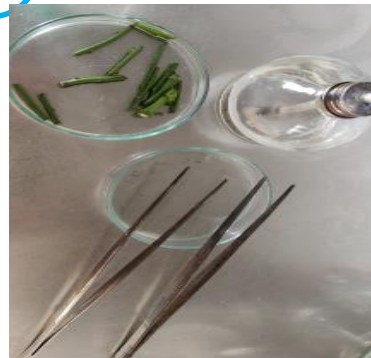
- 10 min en fungicida y bactericida
- Jabón -20min
- Un Enjuague -5 min
- Cloro 2%-15 min
- Dos Enjuagues -5min
- Alcohol 70%-1min
- Enjuague -10min

- Pinzas
- Alcohol
- Mechero
- Cajas Petri

Preparación del material

Siembra en los frascos.

- Los microexplantes se sembraron en todos los tratamientos.
- Se los puso en la incubadora a 20 °C con 16 horas luz y 8 de oscuridad.





Contaminación

T0: solo medio

T1: 200 mg*L⁻¹ de Benomil+ 200mg*L⁻¹ de Estreptomicina,

T2: 15 ml de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

T3: 15 ml de sobrenadante *B. subtilis* CtpxS3-5



Oxidation

T0: solo medio

T1: 500 mg*L⁻¹ de carbón activado,

T2: 15 ml de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

T3: 15 ml de sobrenadante *B. subtilis* CtpxS3-5



Longitud de brotes

T0: sin ácido 3-indol acético

T1: 0,5 ppm de ácido 3-indol acético (AIA) comercial,

T2: 20.3 ml de sobrenadante de *B. subtilis* CtpxS2-1

T3: 15.6 ml de sobrenadante *B. subtilis* CtpxS3-5



Variables a medir

Contenido de AIA



Número de hojas



Altura de brotes



Peso fresco



Porcentaje de contaminación



Porcentaje de Brotes

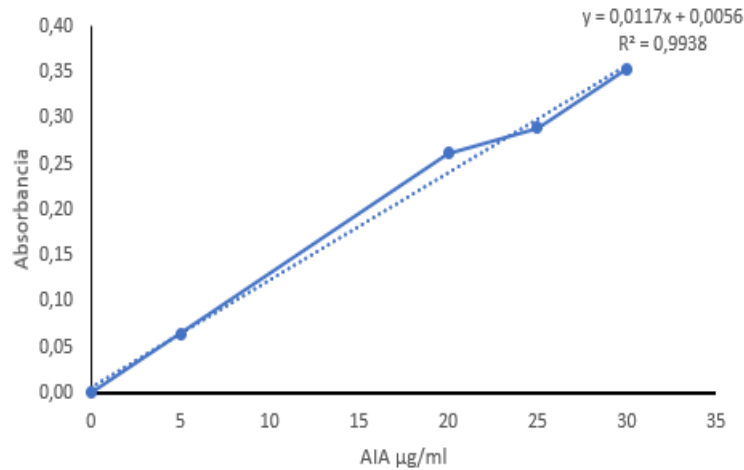


Porcentaje de oxidación



Porcentaje de germinación

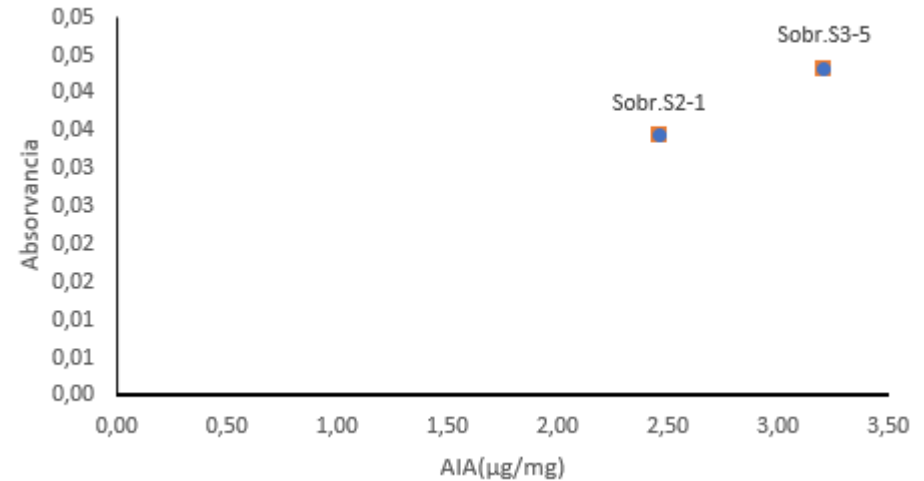
Figura 8. Curva de calibración del espectrofotómetro para identificar el contenido de AIA



Nota. Autoría propia

Se identificó que las muestras de los sobrenadantes de *B. subtilis* S2-1 y S3-5 contienen (2.46 y 3.21 µg/mg de AIA), respectivamente.

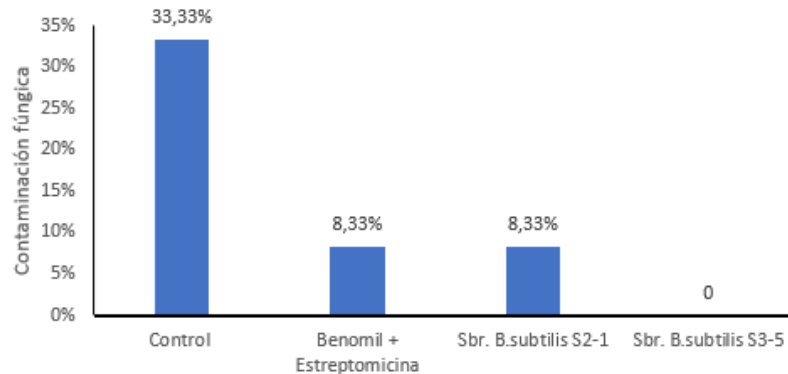
Figura 9 Contenido de AIA en los sobrenadantes de las cepas de *B. subtilis* S2-1 y S3-5



Resultados similares obtuvieron (Anguiano et al., 2017) quienes encontraron una concentración de auxinas en las cepas de *B. subtilis* de 2,78 ppm para la cepa BS8 y 2,59 ppm para BS14. La detección de auxinas en las cepas de *B. subtilis* demostraron que estos microorganismos son capaces de producir AIA en cantidades adecuadas para promover el crecimiento de las plantas, a más de reducir significativamente la incidencia o severidad de diversas enfermedades en los cultivos, Falconí y Yáñez (2022); Yáñez & Falconi (2021); Yáñez & Falconi (2018).

Porcentajes contaminación

Figura 10. Porcentaje de contaminación fúngica de los microexplantes de *V. myrtillus* en medio Murashige and Shook modificado, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas de 20 °C con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.

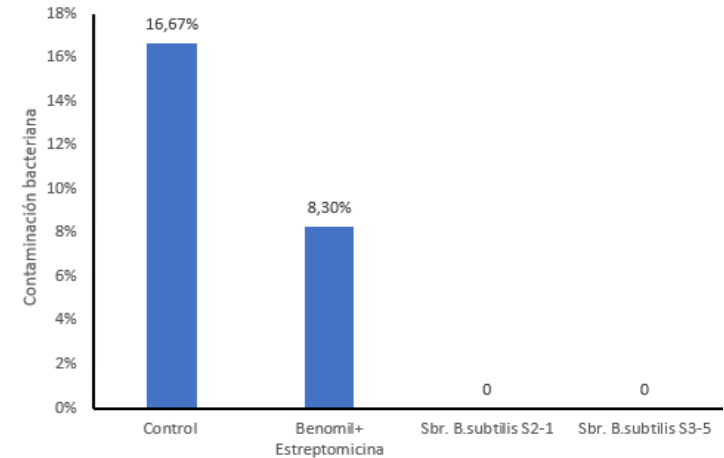


Nota. Autoría propia

la contaminación por hongos y bacterias fue de 50% sin la aplicación de tratamientos con sobrenadante de *B. subtilis*

Brenes & Matamoros (2015) en la micropropagación de diferentes variedades de arándano (*Vaccinium spp.*) en donde el promedio de segmentos nodales contaminados fue de 44%, sin la utilización de fungicidas y bactericidas. La utilización de sobrenadantes de bacterias PGPR representan una alternativa muy viable para reducir considerablemente la contaminación en el cultivo de tejidos.

Figura 11 Porcentaje de contaminación bacteriana de los microexplantes de *V. myrtillus*. en medio Murashige and Shook modificado, luego 45 días de la introducción, en condiciones controladas de 20 °C con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora

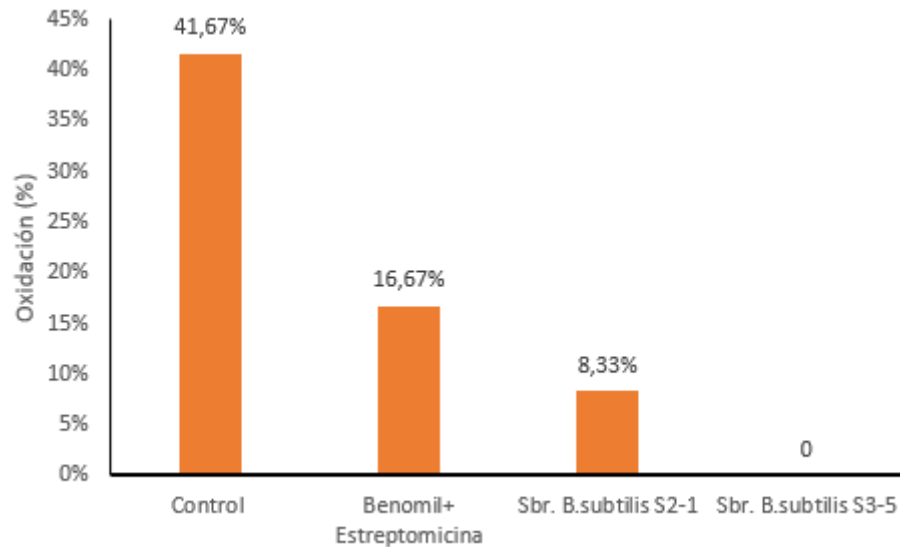


Nota. Autoría propia

Amiri *et al.* (2022) quienes utilizaron el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* ABRIINW.N8 en las diferentes etapas de micropropagación de *Rosa damascena* Mill y concluyeron que el probiótico producido por *Lactobacillus plantarum* ABRIINW.N8 elimina por completo la contaminación fúngica y bacteriana siendo más efectivo que cefaloxine y tetraciclina juntos. Además, Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018), A través de TLC encontraron lipopéptidos de fengicina, iturina y surfactina, demostrando que la fuerte actividad antifúngica se debe a los lipopéptidos de fengicina.

Porcentaje de oxidación

Figura 12, Porcentaje de oxidación de los microexplantes de *V. myrtillus*. en medio Murashige and Shook modificado, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas a 20 °C de temperatura con 16 horas de luz y 6 de oscuridad, dentro de una incubadora.



Nota. Los datos se tomaron a los 45 días después de la fase de introducción. Autoría propia

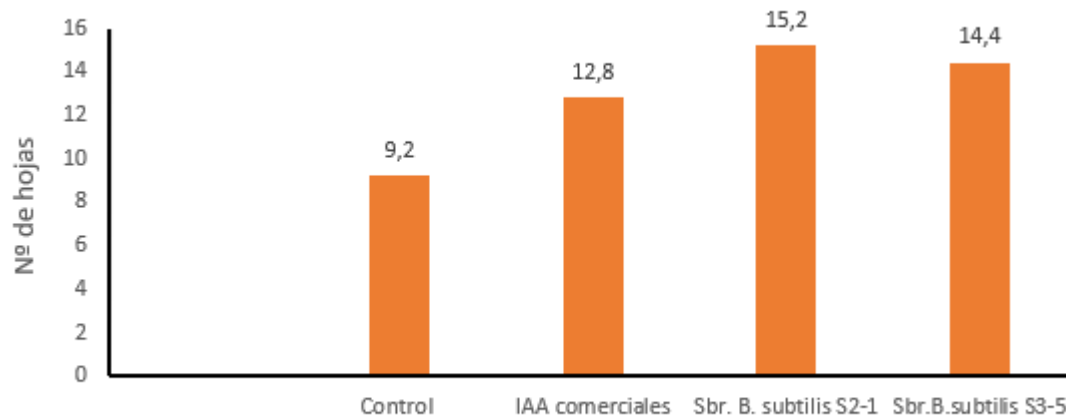
La oxidación se redujo por completo con el sobrenadante de la cepa *B. subtilis* S3-5, y con el sobrenadante *B. subtilis* S2-1 se redujo en un 91.67% (Figura 12).

Padró *et al.* (2021) quienes realizaron la aplicación de la bacteria in vivo en injertos de tomate logrando un éxito del 95%, además ellos mencionan que *B. subtilis* es capaz de neutralizar el 100% de los radicales libres.

Finalmente Giri *et al.* (2019) mencionan que los microorganismos también son fuentes potenciales de antioxidantes naturales, incluidos varios productos fermentados de especies de *Aspergillus*, *Rhizopus* y *B. subtilis*. Los Biosurfactantes derivados de *B. subtilis* VSG4 o *B. licheniformis* VS16 exhibieron una capacidad antioxidante satisfactoria, como lo revelaron los ensayos de eliminación de radicales hidroxilos y 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) causantes de la oxidación

RESULTADOS

Figura 13. Medias del número de hojas de los brotes de los microexplantes de *V. myrtillus*, luego de 45 días de la introducción, en condiciones controladas dentro de una incubadora



Nota. Autoría propia.

El mayor número de hojas se obtuvo con los sobrenadantes de las cepas S2-1, seguido de la cepa S3-5 siendo mayores al control y al tratamiento con auxinas comerciales (Figura 13). Esto sugiere la presencia de citoquininas en los sobrenadantes de *B. subtilis*

Mencionan Sorokan *et al.* (2021) quienes mostraron que la cepa endofítica *Bacillus subtilis* 26D (Cohn) es capaz de secretar 0.150 µg/ml de citoquininas en el medio de cultivo

. Además Sosnowski *et al.* (2019) mencionan que la citoquinina aplicada durante la etapa vegetativa de *Medicago x varia T. Martyn* aumentó el número de hojas, pero su tamaño fue más pequeño, lo que resulta en una menor masa y peso.

Finalmente Schuchovski & Biasi (2019), utilizaron la concentración más baja, de 0.55 ZEA (citoquinina) µg/ml, misma que promovió el mayor número de hojas, que fue 10,0 hojas por brote. Valores similares obtenidos en nuestro estudio (Figura 13).



RESULTADOS

Tabla 3. Media \pm desviación estándar de la altura (mm) en brotes de microexplantes de *V. myrtillus* en condiciones in vitro.

Tratamientos	Día 15			Día 30			Día45		
	Media	\pm	D.E.	Media	\pm	D.E.	Media	\pm	D.E.
T1: AIA comercial	7,42	\pm	1,16 ^a	29,08 ^c	\pm	2,78	48,17 ^c	\pm	3,61
T2: Sbr. S2-1	7,83	\pm	2,92 ^a	23,25 ^b	\pm	2,63	39,83 ^b	\pm	3,33
T3: Sbr. S3-5	6,92	\pm	2,02 ^a	18,75 ^a	\pm	2,9	28,67 ^a	\pm	1,92
T0: Control	6,00	\pm	1,04 ^a	17,92 ^a	\pm	2,71	29,5 ^a	\pm	2,07

Nota. Medidas con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente diferentes. Los valores después del signo \pm corresponden a la desviación estándar. Autoría propia.

Se puede observar en la Tabla 3 que luego del día 45, el tratamiento con AIA comercial tuvo la media mayor en altura con 48,17mm, seguido del sobrenadante de la cepa S2-1 con 39.83 mm.

Brissette *et al.* (1990) En la micropropagación de *V. myrtillus Lowbush* cuando existe mayor presencia de brotes axilares, la longitud de los mismos disminuye.

Cabello *et al.* (2019) La concentración de fitohormonas debe ser adecuada, ya que la deficiencia o exceso de ellas inhibe el crecimiento vegetal



Tabla 4. Prueba Tukey del peso fresco (mg) de los brotes de microexplantes de *V. myrtillus* en condiciones in vitro

Tratamiento	Medias	n		
Control	33,33	3	A	
Sbr. <i>B. subtilis</i> S3-5	61,75	3		B
Sbr. <i>B. subtilis</i> S2-1	70,08	3		B
AIA comercial	98,42	3		C

Nota. Letras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Donde n es la cantidad de muestras por tratamiento. Autoría propia

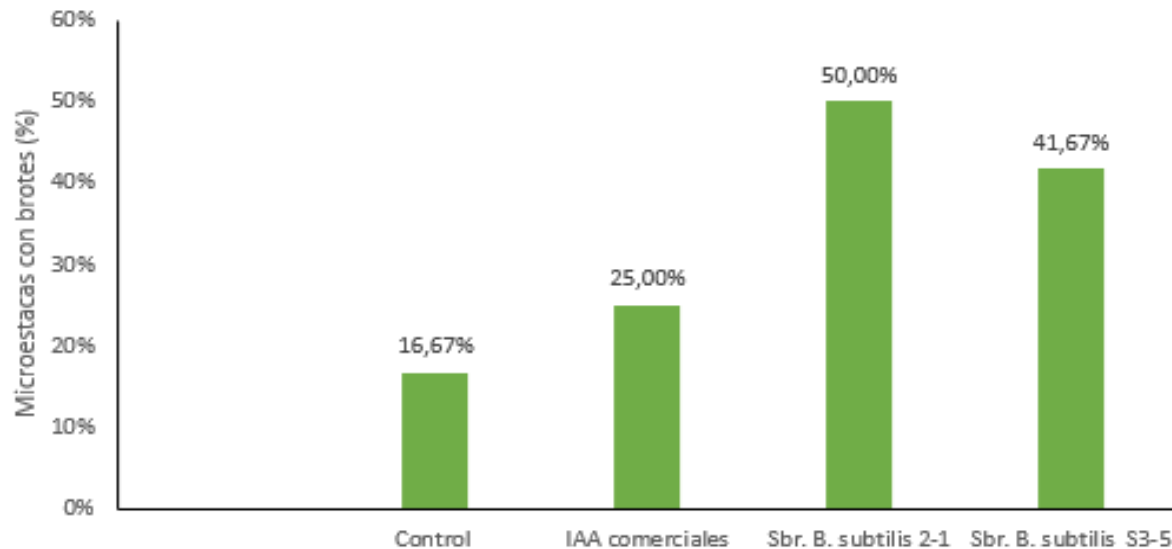
Se puede observar en la Tabla 4 que el mejor tratamiento es el que se utiliza el AIA comercial dándonos como resultado una media del peso fresco de 98.42 mg, seguido de los tratamientos con sobrenadantes de las cepas S2-1 y S3-5 con una media en el peso de 70.08 mg y 61.75 mg.

Sosnowski *et al.* (2019) que la citoquinina aplicada durante la etapa vegetativa de *Medicago x varia T. Martyn* aumentó el número de hojas, pero su tamaño es más pequeño, lo que resulta en una menor masa y peso.

Xiao-Ping & Xi-Gui (2006) mencionan que las respuestas de las estomas a las citoquininas dependen de la variedad y concentración de las citoquininas, puede ocasionar la apertura de las estomas en la oscuridad, produciendo una pérdida de agua y por ende un menor peso en fresco.



Figura 14. Presencia de brotes provenientes de microexplantes de *V. myrtillus* con. en medio Murashige and Shook modificado o por efecto del tratamiento con sobrenadantes de *B. subtilis*.



Nota. Autoría propia

En la Figura 14 podemos observar que los tratamientos con mayor porcentaje de brotes fueron los que recibieron sobrenadantes de *B. subtilis* de las cepas S2-1 y S3-5. Esto puede ser gracias a la presencia de citoquininas en los sobrenadantes de *B.subtilis*.

Schuchovski & Biasi (2019), quienes utilizaron la concentración más baja, de 0.55 ZEA (citoquinina) $\mu\text{g}/\text{m}$ en la micropropagación de *V. myrtillus* *Rabbiteye*, y promovieron la formación de brotes nuevos (81,3%). Esta concentración produjo un número de 1,3 brotes nuevos. Valores cercanos con nuestro estudio



CONCLUSIONES

El sobrenadante de *B. subtilis* S3-5 tuvo un efecto positivo al reducir por completo la presencia de hongos y bacterias, demostrando que es una alternativa factible para sustituir bactericidas y fungicidas químicos, en el cultivo in vitro, que son muy utilizados en la fase de introducción especialmente en microexplantes de plantas leñosas que son más susceptibles a la contaminación.

El efecto antioxidante de sobrenadantes de *B. subtilis* S3-5 fue superior e incluso más beneficioso que el carbón activado, ya que este compuesto no solo absorbe los fenoles producidos por los microexplantes si no también es parte de los reguladores de crecimiento y nutrientes presentes en el medio de cultivo.

Los sobrenadantes de *B. subtilis* de la cepa S2-1 y S3-5 suplementados en el medio de cultivo, tuvieron un impacto positivo en generar brotes y en el número de hojas, de los microexplantes de *V. myrtillus*, en comparación con el tratamiento suplementado con AIA comercial, por tanto, los sobrenadantes de *B. subtilis* se pueden utilizar como una fuente de biocontrol y una alternativa para el uso de fitohormonas, por su capacidad bioestimulante en el cultivo de tejidos vegetales.



RECOMENDACIONES

Continuar con el seguimiento de las plantas micropropagadas con sobrenadante de *B. subtilis* S2-1 y S3-5 hasta llegar a su etapa adulta, para identificar su resistencia a plagas, enfermedades, tolerancia al estrés biótico y abiótico; además de su productividad.

Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en el sobrenadante de *B. subtilis* S2-1 y S3-5, para identificar sus beneficios en otros campos de la ciencia.

Realizar más ensayos en las cuatro etapas de micropropagación de diferentes especies vegetales leñosas.

Realizar un análisis económico, de la utilización del sobrenadante de *B. subtilis* S3-5 en biofábricas dedicadas al cultivo de tejidos vegetales.





Gracias por su atención



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA