



UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMIA

Trabajo de Integración
Curricular previo a la obtención
del Grado Académico de
Ingeniero Agrónomo.

Proyecto de investigación:

“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE ACTINOBACTERIAS COMO PGPR EN
PLANTAS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum*)”

Autor:

Lady Michelle Sierra Arriaga

Director del proyecto de investigación:

Biol. Fernando Abasolo Pacheco, PhD.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2023



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Lady Michelle Sierra Arriaga**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Lady Michelle Sierra Arriaga

C.C: 0941732398



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito **Ing. Fernando Abasolo Pacheco, PhD.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Lady Michelle Sierra Arriaga**, realizó el Proyecto de Investigación de Grado titulado “**Efecto de la inoculación de actinobacterias como PGPR en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)**.”, previo a la obtención del Grado Académico de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Biol. Fernando Abasolo Pacheco, PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito, **Biol. Fernando Abasolo Pacheco, PhD.**, mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe de proyecto de Investigación titulado “**Efecto de la inoculación de actinobacterias como PGPR en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)**”, Presentado por la estudiante **Lady Michelle Sierra Arriaga**, egresado de la Carrera de Agronomía, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de URKUND el cual avala los niveles de originalidad en un 97% y similitud 3%, del trabajo investigativo. Valido este documento para que el estudiante siga con los trámites pertinentes, de acuerdo como lo establece el Reglamento.

URKUND	
Documento	Tesis_LadySierra.docx (D178883588)
Presentado	2023-11-15 10:18 (-05:00)
Presentado por	lady.sierra2017@uteq.edu.ec
Recibido	fabasolo.uteq@analysis.orkund.com
Mensaje	Tesis Lady Sierra Mostrar el mensaje completo
3% de estas 24 páginas, se componen de texto presente en 8 fuentes.	

Biol. Fernando Abasolo Pacheco, PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMIA (REDISEÑO)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

Efecto de la inoculación de actinobacterias como PGPR en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)

Presentado a la Comisión Académica de la Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Silvia Gicela Saucedo Aguiar PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Víctor Manuel Guamán Sarango PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Cesar Ramiro Bermeo Toledo MSc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2023

AGRADECIMIENTO

A Dios, al universo y a la vida que crearon las oportunidades y me dieron la sabiduría necesaria para culminar con éxito este proyecto.

A mis padres quienes siempre me apoyaron durante todos los años de mi carrera, por brindarme sus consejos, sabiduría y darme la oportunidad de continuar mis estudios sin interrupciones.

Al proyecto FOCICYT, novena convocatoria, titulado “Actinomicetos con potencial biotecnológico en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L)”, bajo la dirección del Dr. Fernando Abasolo Pacheco.

A mi director de tesis Dr. Fernando Abasolo Pacheco, que siempre se mostró interesado y preocupado por brindarme todo su conocimiento.

Al Ing. Ángel Cedeño y el Ing. Erick García, quienes siempre aportaron con ideas y técnicas e hicieron que el trabajo sea más ameno y divertido.

A mis amigas y compañeras de laboratorio Karla y Dennisse que aportaron con grandes ideas y acompañaron en todo el proceso creando recuerdos y momentos inolvidables.

A todos mis compañeros y amigos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo Juan, Terrero, Paul, Oscar, Magno, Kelina, Jenniffer, Dennisse, Bryan, Selena, Vanesa, Kevin, quienes supieron apoyarme en todo el transcurso de mi carrera y proyecto de investigación dándome ánimos y con quienes forje una amistad trascendental.

A todos quienes en algún momento me brindaron su ayuda desinteresada deseándome el mayor éxito.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo con todo el amor y cariño a mis padres Máximo y Marisol quienes han sido fundamentales en mi desarrollo profesional y me han brindado siempre todo su amor, apoyo y sabios consejos.

A mis hermanos Madeline y Marlon que han sido fuente de mi inspiración por superarme y querer hacer siempre bien las cosas con el mayor esfuerzo y dedicación.

A mi novio Fabian quien siempre fue mi apoyo emocional en los momentos más difíciles me motivo a continuar y no rendirme.

Lady Michelle Sierra Arriaga

RESUMEN

El uso de alternativas más ecológicas y eficientes a los fertilizantes sintéticos es cada vez más requerido, las actinobacterias presentan la capacidad de funcionar como bioestimulantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas de pimiento bajo condiciones de vivero. Bajo este principio la investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de actinobacterias en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*). La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Campus Experimental “La María” bajo condiciones controladas. Se utilizó un diseño completamente al azar. Se recolectaron muestras de suelo de diferentes partes del Ecuador, del Guayas, Los Ríos y Esmeraldas, donde se obtuvieron un total de 20 cepas de actinobacterias y se caracterizaron 9 cepas morfológica y bioquímicamente. Se activaron y prepararon fermentos de las cepas en medio líquido ISP2 (International Streptomyces Project) las cuales se utilizaron para la inoculación de semillas y plantas de pimiento. Además se obtuvieron morfotipos variados entre cada cepa de las distintas zonas de donde fueron aisladas, las cuales presentaron características en colores, texturas y estructuras filamentosas típicas de las actinobacterias. En esta investigación se utilizaron 4 cepas (BA, EM, GC2, GC4) que demostraron tener mayor potencial como PGPR en pimiento. Se evaluaron características agronómicas de las semillas y las plantas. Todas las cepas promovieron un mayor desarrollo de las plantas respecto al control, la cepa EM promovió una mayor altura de planta (10.29 cm) y longitud radicular (20.24 cm), así como la cepa GC2 produjo un mayor número de raíces secundarias en 1 cm (16). Como conclusión las actinobacterias influyen positivamente en el desarrollo agronómico de las plantas de pimiento.

Palabras clave: Bioestimulante, microorganismo, tinción de Gram.

ABSTRACT

The use of more ecological and efficient alternatives to synthetic fertilizers is increasingly required, actinobacteria have the ability to function as biostimulants for the growth and development of bell pepper plants under nursery conditions. Under this principle, the objective of this research was to evaluate the effect of actinobacteria inoculation on bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. The research was carried out in the facilities of the Experimental Campus "La María" under controlled conditions. A completely randomized design was used. Soil samples were collected from different parts of Ecuador, from Guayas, Los Ríos and Esmeraldas, where a total of 20 strains of actinobacteria were obtained and 9 strains were characterized morphologically and biochemically. Ferments of the strains were activated and prepared in ISP2 (International Streptomyces Project) liquid medium, which were used for the inoculation of bell pepper seeds and plants. In addition, different morphotypes were obtained between each strain from the different areas from which they were isolated, which presented characteristics in colors, textures and filamentous structures typical of actinobacteria. Four strains (BA, EM, GC2, GC4) were used in this research, which showed the greatest potential as PGPR in bell pepper. Agronomic characteristics of seeds and plants were evaluated. All strains promoted greater plant development with respect to the control, the EM strain promoted greater plant height (10,29 cm) and root length (20,24 cm), and the GC2 strain produced a greater number of secondary roots in 1 cm (16). In conclusion, actinobacteria have a positive influence on the agronomic development of bell pepper plants.

Keywords: Biostimulant, microorganism, Gram stain.

TABLA DE CONTENIDO

Portada.....	i
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iii
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	iv
Certificado de aprobación por tribunal de sustentación	v
Agradecimiento	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Código dublín	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	
1.1. Problema de Investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema	4
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos	6
1.3. Justificación	7
CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	
2.1. Marco conceptual	9
2.1.1. Actinobacterias	9
2.1.2. Bioestimulantes	9
2.1.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	9
2.2. Marco referencial.....	10

2.2.1. Cultivo del pimienta	10
2.2.2. Taxonomía del pimienta	10
2.2.3. Características botánicas del pimienta	11
2.2.4. Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de pimienta	12
2.2.5. Sustrato	13
2.2.6. Actinobacterias	14
2.3. Revisión histórica del tema en estudio	16
CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	
3.1. Localización.....	19
3.2. Tipo de investigación	19
3.3. Método de investigación.....	19
3.4. Fuente de recopilación de información	19
3.5. Diseño de la investigación.....	20
3.5.1. Tratamientos	20
3.5.2. Diseño experimental	20
3.6. Instrumentos de investigación	21
3.6.1. Manejo del experimento	21
3.6.2. Variables evaluadas	26
3.7. Tratamiento de los datos.....	29
3.8. Recursos humanos y materiales.....	29
3.8.1. Recursos humanos	29
3.8.2. Material vegetal	29
3.8.3. Material genético	29
3.8.4. Material de laboratorio	29
3.8.5. Equipo de laboratorio	30
3.8.6. Material de vivero.....	30
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados.....	32
4.1.1. Morfología de las cepas de actinobacterias	32

4.1.2. Caracterización bioquímica	33
4.1.3. Porcentaje de germinación.....	33
4.1.4. Índice de velocidad de emergencia.....	34
4.1.5. Altura de planta	35
4.1.6. Número de hojas	35
4.1.7. Diámetro del hipocótilo	36
4.1.8. Longitud de la radícula en semillas de pimiento	37
4.1.9. Longitud radicular en plantas de pimiento	37
4.1.10. Número de raíces secundarias en 1cm.....	38
4.1.11. Peso del hipocótilo	39
4.1.12. Peso de la radícula	39
4.2. Discusión	41
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	
5.1. Conclusiones.....	45
5.2. Recomendaciones	46
CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA.....	
6.1. Bibliografía	48
CAPÍTULO VII ANEXOS.....	
7.1. Anexos	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del pimiento	10
Tabla 2. Tratamientos con actinobacterias rizosféricas	20
Tabla 3. ADEVA del diseño experimental completamente aleatorizado (DCA).....	20
Tabla 4. Lugar de procedencia de las actinobacterias y código	22
Tabla 5. Características morfológicas de las cepas de actinobacterias.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Ecuador con los puntos estratégicos de muestreo de suelo.....	21
Figura 2. Porcentaje de recuperación de actinobacterias de diferentes zonas del Ecuador	23
Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas de pimienta	34
Figura 4. Índice de emergencia en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias ...	34
Figura 5. Altura de las plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias	35
Figura 6. Número de hojas en plántulas de pimienta inoculadas con actinobacterias	36
Figura 7. Diámetro del hipocótilo en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias	36
Figura 8. Longitud de radícula en semillas de pimienta <i>in vitro</i>	37
Figura 9. Longitud radicular en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias.....	38
Figura 10. N° de raíces secundarias en plantas de pimienta inoculadas con actinobacteria	38
Figura 11. Peso del hipocótilo en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias	39
Figura 12. Peso de la radícula en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A.	Procesamiento de muestras de suelo y aislamiento de actinobacterias.	56
Anexo B.	Caracterización morfológica de actinobacterias.	56
Anexo C.	Tinción de Gram de las cepas de actinobacterias, lente 100x.	57
Anexo D.	Prueba de catalasa.....	58
Anexo E.	Elaboración de fermentos de actinobacterias.	58
Anexo F.	Establecimiento del experimento <i>in vitro</i>	58
Anexo G.	Establecimiento del experimento <i>in vivo</i>	59
Anexo H.	Evaluación de variables.	59
Anexo I.	Análisis de varianza de porcentaje de germinación.....	59
Anexo J.	Análisis de varianza del índice de velocidad de emergencia.....	60
Anexo K.	Análisis de varianza de la altura de la planta.....	60
Anexo L.	Análisis de varianza número de hojas de la planta.	60
Anexo M.	Análisis de varianza del diámetro del hipocótilo.....	61
Anexo N.	Análisis de varianza de longitud de radícula de semillas de pimiento <i>in vitro</i> . 61	
Anexo O.	Análisis de varianza de la longitud radicular.....	61
Anexo P.	Análisis de varianza del número de raíces secundarias.	61
Anexo Q.	Análisis de varianza del peso del hipocótilo.....	62
Anexo R.	Análisis de varianza del peso de la radícula.	62

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	Efecto de la inoculación de actinobacterias como PGPR en plantas de pimiento (<i>Capsicum annuum</i>)
Autora:	Lady Michelle Sierra Arriaga
Palabras clave:	Bioestimulante, microorganismo, tinción de Gram
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2015
Resumen:	El uso de alternativas más ecológicas y eficientes a los fertilizantes sintéticos es cada vez más requerido, las actinobacterias presentan la capacidad de funcionar como bioestimulantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas de pimiento bajo condiciones de vivero. Bajo este principio la investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de actinobacterias en plantas de pimiento (<i>Capsicum annuum</i>). La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Campus Experimental “La María” bajo condiciones controladas. Se utilizó un diseño completamente al azar (...)
Abstract:	The use of more ecological and efficient alternatives to synthetic fertilizers is increasingly required, actinobacteria have the ability to function as biostimulants for the growth and development of bell pepper plants under nursery conditions. Under this principle, the objective of this research was to evaluate the effect of actinobacteria inoculation on bell pepper (<i>Capsicum annuum</i>) plants. The research was carried out in the facilities of the Experimental Campus "La María" under controlled conditions. (...)
Descripción	78 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
Url:	

Introducción

El pimiento (*Capsicum annuum*) es un cultivo producido a nivel mundial por su alta demanda alimenticia y elevado consumo en la población, esto debido a sus características nutricionales que agregan beneficios a la salud humana como un alimento funcional gracias a la concentración de antioxidantes y elevado contenido de ácido ascórbico, caroteno, fenoles, flavonoides y xantofilas, los cuales se obtienen con el fruto verde o maduro (Ispizua, *et al.*, 2020).

Actualmente la agricultura convencional es una de las formas de obtener los mayores rendimientos en el sector agrario, para ello hacen uso de grandes cantidades de fertilizantes químicos (Angulo, *et al.*, 2021), esto tiene un impacto negativo en los ecosistemas generando efectos como eutrofización, toxicidad de las aguas, contaminación de aguas subterráneas, contaminación del aire, degradación del suelo y de los ecosistemas, desequilibrios biológicos y reducción de la biodiversidad (González, 2019) (Palacios, *et al.*, 2018).

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son una opción para preservar el equilibrio de los agroecosistemas y al mismo tiempo lograr lo sostenibilidad de la producción agrícola. (Liu, *et al.*, 2017) (Palacios, *et al.*, 2018), tienen múltiples beneficios en el desarrollo de las plantas mediante algunos mecanismos directos como la fijación de nitrógeno, solubilización de minerales, concentración de fitohormonas; y mecanismos indirectos como son la producción de metabolitos, actividad lítica, resistencia sistémica, competencia y desplazamiento de microorganismos patógenos (Posada, *et al.*, 2021).

Se han identificado hasta 22 mecanismos de acción PGPR y dentro de los más abundantes se encuentra el ácido indolacético (AIA), solubilización de fósforo, producción de sideróforos y antagonismo (Posada, *et al.*, 2021) son los responsables del desarrollo de las plantas y la acción biocontroladora, que tiene que ver con la producción de fitohormonas, inhibición de fitopatógenos, y solubilización de nutrientes (Khushboo y Kaur, 2020).

Algunos estudios han demostrado las aplicaciones de las actinobacterias como agentes reguladores del crecimiento vegetal en plantas, (Khushboo y Kaur, 2020) probaron con cepas de *Streptomyces diastaticus* y demostraron que aumentó el porcentaje de germinación de semillas de pimiento, así como mayor longitud en raíz y brotes, y más peso fresco y seco de

la biomasa; (Arawan y Boonkerd, 2013) evidenció la acción de actinobacterias del género *Streptomyces* y *Nocardia* que en promedio, la altura de los brotes y el peso fresco de las plántulas de mandarina fueron promovida por su inoculación (Arawan y Boonkerd, 2013).

Estos antecedentes demuestran el potencial de las actinobacterias como una vía sostenible para el desplazamiento total o parcial de fertilizantes químicos y aumento de producción de los cultivos. La presente investigación pretende evaluar los efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (actinobacterias) en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) bajo condiciones controladas para mejorar sus características agronómicas.

.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

La calidad del cultivo de pimiento (*Capsicum annuum*) depende en gran medida de los nutrientes que tenga disponible en las etapas claves de su desarrollo y de su actividad en el sistema de defensa ante agentes patogénicos. Esto ocasiona que los productores por la necesidad de obtener mejores y mayores resultados administren agroquímicos en dosis inadecuadas a las necesidades del cultivo, lo que termina generando una mayor contaminación al ambiente y a largo plazo degradando los suelos.

Además, el uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos y plaguicidas ha ocasionado la degradación de los ecosistemas, creando contaminación a nivel del suelo, agua y aire esto debido a sus características moleculares, que en ocasiones dejan residuos que no pueden ser degradados y permanecen en el ambiente por un tiempo prolongado, lo cual pone en riesgo la salud y bienestar de los seres vivos.

Diagnóstico

Muchos agricultores al no contar con alternativas de manejos ecológicos para la fertilización de los cultivos optan por utilizar fertilizantes sintéticos que generan contaminación al medio ambiente como la contaminación de acuíferos y la degradación de suelos.

Pronóstico

Las plantas al no tener disponibilidad de los minerales necesarios darán como resultado frutos de baja calidad o incluso enfermos, que no cumplen con los estándares de calidad de los mercados, además de no poder cubrir la demanda de alimentos.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son los efectos que tiene la inoculación de las actinobacterias sobre desarrollo morfológico en las plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)?

1.1.3. Sistematización del problema

¿Qué tipos de morfologías presentan las cepas de actinobacterias aisladas del suelo?

¿Qué porcentaje de germinación obtienen las semillas de pimiento luego de ser tratadas con las actinobacterias?

¿Cuál es la respuesta morfológica que presentan las semillas y plantas tratadas con las actinobacterias?

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la inoculación de actinobacterias en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*).

1.2.2. *Objetivos específicos*

- Aislar y caracterizar morfológicamente cepas de actinobacterias rizosféricas.
- Determinar la tasa de germinación de las semillas de pimiento inoculadas con la actinobacterias.
- Analizar las variaciones en características agronómicas de las semillas y plantas tratadas con las cepas de actinobacterias.

1.3. Justificación

El cultivo de pimiento (*C. annuum*) presenta una creciente demanda alimenticia y este incremento hace que los agricultores muestren interés por opciones que den mayores rendimientos al final de los ciclos productivos sin crear una dependencia a los fertilizantes y plaguicidas de origen químico. El uso de actinobacterias como respuesta frente a las necesidades nutricionales de las plantas representa una alternativa ecológica ya que cumplen funciones como reducir el estrés de las plantas, activar sistemas de defensa y aumentar la producción de los cultivos incluso en suelos contaminados o degradados.

Debido a esto las actinobacterias funcionan como estimulantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas los cuales pueden aumentar la asimilación y solubilización de nutrientes, si bien su extensión dentro de los campos ecuatorianos no es muy amplia, sus beneficios deben ser difundidos y apuntar hacia una agricultura más sustentable.

Mediante esta investigación se podrá recopilar información que fundamenta la aplicación de esta herramienta biotecnológica, promoviendo el uso de esta y otorgando una opción viable a los agricultores para mejorar sus cultivos de forma más sostenible económica y ecológicamente de estos agroecosistemas.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Actinobacterias

Las actinobacterias pertenecen a un grupo muy diverso de microorganismos Gram positivos, aerobios estrictos, son capaces de descomponer la materia orgánica del suelo, la mayoría de sus especies son de crecimiento unicelular y tienen estructuras filamentosas las cuales son características que permiten su identificación, así como la apariencia de la colonia que tiene que ver con su coloración, aspecto, forma, consistencia, producción de pigmentos entre otras. Su importancia destaca por su capacidad de producir moléculas bioactivas con aplicaciones en la agricultura y otros ámbitos (Evangelista, *et al.*, 2017).

2.1.2. Bioestimulantes

Se considera bioestimulante a todos los compuestos de origen biológico que promueven un mejor desarrollo en las plantas gracias a sus efectos constituyentes y no solamente por consecuencias especiales como reguladores de crecimiento o control biológico de patógenos (Yakhin *et al.*, 2017). Es considerado como sustancia o microorganismos que al ser aplicadas directamente en las plantas, semillas o raíces promueven el crecimiento y aumentan la absorción de nutrientes y la tolerancia a estrés por factores bióticos y abióticos mejorando así la calidad en la producción de los cultivos (Farm Bill, 2018).

2.1.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

El suelo es el nicho ecológico de muchos microorganismos que interactúan entre sí y con otras especies como las plantas, las PGPR son un conjunto de bacterias que promueven el desarrollo y resistencias de las especies vegetales, entre esos mecanismos encontramos protección de las plantas frente al estrés abiótico, la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas esenciales como las auxinas, citoquininas y giberelinas, y funcionan como biocontroladoras mediante la producción de sideróforos, antibióticos o activación del sistema de resistencia inducida (Goswami, *et al.*, 2016).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Cultivo del pimiento

El pimiento (*Capsicum annuum L*), también conocido como pimiento dulce, es un cultivo hortícola muy extendido, originario de América Central y del Sur. Aunque hay varias formas de pimientos dulces, la mayoría tienen forma de campana, por lo que el término "pimiento morrón" es más común (Ciju, 2021).

Se encuentran desde el sur de los Estados Unidos (sur de Arizona) hasta Colombia o el norte del Perú. Se considera a México como su centro de domesticación, allí se han encontrado semillas en restos arqueológicos de 6500 a 5000 años AC y es donde hoy día se encuentra la mayor diversidad de especies (Fornaris, 2015).

Es una planta que crece de forma erecta y puede alcanzar de 2 a 5 pies de altura, su desarrollo foliar suele ser lento en comparación con otras plantas, una característica propia de la planta es que su actividad fotosintética se mantiene en las etapas tardías de fructificación, su sistema radicular es vigoroso por naturaleza sin embargo cuando las plantas son trasplantadas se ve reducido (Fornaris, 2015).

2.2.2. Taxonomía del pimiento

De acuerdo con Zhigila *et al.*, (2014) el pimiento tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 1

Clasificación taxonómica del pimiento

Clasificación taxonómica	
Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Filo	Espermatofita
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Solanales
Familia	Solanáceas
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>annuum</i>

Fuente: (Zhigila *et al.*, 2014)

Elaborado: Autor

2.2.3. Características botánicas del pimiento

2.2.3.1. Raíz.

Cuenta con una raíz pivotante y profundo, con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 cm y 1 m (Oliveira, *et al.*, 2018).

2.2.3.2. Tallo.

Según (Gomez, *et al.*, 2017) el tallo cuenta con una ramificación dicotómica, erecta y con altura que varía según la especie entre 0,30 a 1,2 m. A partir de cierta altura emite dos o más ramificaciones hasta culminar su ciclo los tallos secundarios se bifurcan luego de brotar varias hojas.

2.2.3.3. Hojas.

Las hojas son oblongas en forma ovala o de huevo, tienen un largo de 4 a 13 cm y un ancho de 1,5 a 4 cm, el margen de la hoja es liso (Bhagat, *et al.*, 2020). Las hojas pueden presentarse en disposición alterna y opuesta existe cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y peso medio de la fruta (Muchica, 2018).

2.2.3.4. Flores.

Las flores son blancas de aproximadamente 1 cm de ancho, tiene un cáliz dentado, cuentan con cinco pétalos, tienen anteras moradas, amarillentas o azules, son hermafroditas el polen se encuentra en la punta de los machos. Por lo general, son solitarios, pero ocasionalmente se encuentran en pequeños grupos (Pinales, 2015).

2.2.3.5. Fruto.

Cuenta con la forma de una baya con 2 o 4 lóculos que forman cavidades inferiores que en algunos casos tiene divisiones, haciéndolo de características muy variables, con pesos que fluctúan desde unos pocos gramos hasta medio kilo, la forma puede variar entre redonda,

acorazonada, aguzada, cilíndrica y cuadrada, en primera instancia cuenta con una coloración verde que cambia a rojo o amarillo según su etapa de maduración (Vaca, 2021).

2.2.3.6. Semilla.

Son del tipo reniformes aplastadas y de pequeño tamaño entre 3 y 5 mm de longitud, con colores blancos o beige, para su germinación se necesitan solo oxígeno, agua y la temperatura adecuada, esta puede variar de entre 20 a 30 °C y tienen una viabilidad de hasta 4 años dependiendo de las condiciones de almacenamiento (Villegas, *et al.*, 2014).

2.2.4. Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de pimiento

Las plantas de pimiento morrón requieren un clima cálido o templado. La temperatura mínima para germinación y crecimiento es de 15°C mientras que para floración y fructificación es de 18°C (Pedro y Nelson, 2021). Sin embargo, para su desarrollo óptimo durante todas las fases del cultivo los valores oscilan entre 19 °C y 21 °C, inferiores a 15 °C y mayores a 35 °C durante tiempos prolongados pueden afectar su crecimiento (Lorenzoni, *et al.*, 2019).

La humedad óptima para el pimiento es de 50 a 70%, esta condición influye en la polinización y valores cercanos a 100% y debajo de 50% reducirían la calidad del polen por la mucha o poca absorción de agua (Lorenzoni, *et al.*, 2019).

Durante las primeras fases de crecimiento y floración la planta requiere de entre 7 a 8 horas luz al día, comúnmente se adapta bien a alturas de hasta 1800 msnm, los requerimientos de agua dependerán netamente del clima y el tipo de suelo en el que se encuentre (Lorenzoni, *et al.*, 2019).

La planta requiere de suelos profundos, bien drenados, franco-arenosos, con un pH neutro de 6,5 a 7, ricos en nutrientes minerales, y con un contenido de materia orgánica del 3-4%, son susceptibles a suelos con altos niveles de salinidad (Lorenzoni, *et al.*, 2019).

2.2.5. Sustrato

El sustrato es el material en el cual se asentará el crecimiento de la planta, este tiene ciertas ventajas como son contener el agua lo cual dependerá de su forma, partículas y porosidad, llevar un mejor control de microorganismos en el suelo, y mejorar aspectos de fertilización. Es importante que los sustratos se mantengan libres de agentes infecciosos que pueden contener fitopatógenos que afecten el desarrollo de las plantas, también evitar el uso de sustratos contaminados con sustancias tóxicas, o con efecto alelopático contra la germinación de las semillas de pimiento (Mauricio, 2014).

La preparación de los sustratos debe considerar la capacidad de retención de humedad y que sean estériles para no causar efectos contrarios en el desarrollo de las plantas. Actualmente en el mercado existe una gran variedad de sustratos, para condiciones de viveros resaltan algunos como: lana de roca, fibra de coco, perlita y mezclas derivadas de estos (Mauricio, 2014).

Uno de los sustratos más utilizados a nivel de vivero es lana de roca, y está formado a base de roca basáltica fundida y deshilada. Es tan popular debido a su poca reactividad con otros componentes y su gran capacidad para retener la humedad, por lo general es más usado en las primeras etapas del cultivo, como es la germinación y para camas antes del trasplante. (Mauricio, 2014).

Otro sustrato bastante utilizado es la fibra de coco, el mismo que es orgánico y al igual que la lana de roca puede contener grandes cantidades de agua y su drenaje es muy eficiente. Además, tiene un intercambio catiónico de medio a alto y varía dependiendo del origen del producto ya que al ser natural esto suele ser distinto (Mauricio, 2014).

El tamaño de las partículas de la fibra puede variar de tamaño y esto puede ser utilizado para lograr un sustrato más vegetativo o generativo creando mezclas con otras partículas que se requieran en función del tipo de riego y estadio de las plantas (Mauricio, 2014).

2.2.6. Actinobacterias

2.2.6.1. Características generales.

Las actinobacterias están ampliamente distribuidos en hábitats de ecosistemas naturales como el suelo, el suelo de la rizosfera, las plantas con micorrizas de actina, el suelo hipersalino, la piedra caliza, el agua dulce, el mar, las esponjas, las cuevas volcánicas: puntos calientes, el desierto, el aire, los intestinos de los insectos, los excrementos de lombrices de tierra, las heces de las cabras y los hongos endófitos (Manal y Sayeda, 2021).

Pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina en su ADN, y forman parte de una fracción significativa con una densidad poblacional de alrededor de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (Yanez *et al.*, 2020).

Entre los microorganismos más importantes del suelo están las actinobacterias (Castro *et al.*, 2019). Son importante en el reciclaje de la materia orgánica, son de suma importancia en las industrias farmacéutica y alimentaria, en la biorremediación y recientemente en la agricultura, debido a que son fuente importante de sustancias con actividad biológica de gran utilidad para el hombre (Quiñones, 2016).

En particular, las actinobacterias mejoran el crecimiento de las plantas a través de mecanismos, como la síntesis de fitohormonas suministro de nutrientes a las plantas a través de la solubilización de esenciales elementos, como el fosfato, producción de sideróforos y fijación de nitrógeno atmosférico (Djebaili *et al.*, 2020). Además, muchas actinobacterias pueden controlar los fitopatógenos a través de antifúngicos, insecticidas y actividades antibacterianas y producción de enzimas hidrolíticas y cianuro de hidrógeno (Duche, *et al.*, 2021).

2.2.6.2. Condiciones de crecimiento de las actinobacterias.

La mayoría de las especies son heterótrofas, aerobios, mesófilas, se desarrollan en temperaturas de 25°C y 30°C no toleran la acidez, razón por la cual necesitan de un pH neutro para su óptimo crecimiento, aunque crecen en un rango de pH entre 5.0 y 9.0 (Gao y Huang, 2009).

En suelos con un pH menor a 5 son poco comunes observar al igual que en suelos con una alta humedad entre el 85-100% de capacidad de campo, a diferencia con suelos que presentan condiciones semiáridas, con una humedad baja, como los suelos franco-arenosos, son ideales para el desarrollo de estos microorganismos debido a la aireación y poca capacidad para retener agua (González, 2010).

2.2.6.3. Ciclo de vida de las actinobacterias.

El ciclo de vida de una actinobacteria se compone por dos fases de desarrollo o crecimiento (parecido a los hongos) manteniendo la misma tendencia de una bacteria: Fase 1. Trofofase, donde realiza una adaptación metabólica y la síntesis de compuestos esenciales para su crecimiento, es decir los metabolitos primarios, la fase 2. Idiofase, donde comienzan la síntesis de los metabolitos secundarios y culmina su desarrollo (Soriano y Soriano , 2010).

El crecimiento de una actinobacteria en un medio sólido o líquido se visualiza como una masa de crecimiento comúnmente llamada colonia. Es una masa de filamentos ramificados los cuales dan origen a unas células denominadas esporas o conidios a partir del micelio vegetativo (Chen- Fan y Yong-Quan, 2020).

2.2.6.4. Aplicación de actinobacterias como biofertilizante.

Los biofertilizantes son aquellas sustancias creadas a base de células vivas de microorganismos con la capacidad para inhibir el crecimiento de otros microorganismos fitopatógenos otorgando protección a la planta, sintetizar compuestos que regulan el crecimiento de las plantas, fijando nitrógeno, solubilizando hierro o fósforo y protegiendo a la planta del estrés por salinidad, sequía y fitotoxicidad (Armenta, *et al.*, 2010).

Las actinobacterias son reconocidas como bacterias que desempeñan una variedad de funciones en los ecosistemas, entre las cuales se encuentra la mejora de la calidad estructural del suelo y la síntesis de sustancias antagonistas para la inhibición de patógenos, como los antibióticos, siendo esta bacteria el productor principal de estos (Lopez, *et al*, 2021).

Entre todos los géneros de actinobacterias, el que mayormente destaca es el género *Streptomyces* dado que ha sido reportado como potente colonizador de la rizosfera, mediante

un control biológico contra microorganismos patógenos (hongos, bacterias, parásitos, etc.), generando moléculas extracelulares (sideróforos) y reguladores de crecimiento (AIA) y promoviendo la nodulación (Marcela, 2010). Todos estos aportan con el mejoramiento del suelo y favorecen de manera indirecta y directa el desarrollo vegetal (Castro *et al.*, 2019).

Las actinobacterias poseen características similares a las PGPR y como tales se consideran una potencial alternativa como biofertilizantes sin representar un riesgo para otros microorganismos de la rizosfera, contribuyendo así al mantenimiento del equilibrio rizosférico. Esto representa uno de los principales pilares de las investigaciones en el campo de la microbiología del suelo y la interacción planta microorganismo (Pacheco, 2016).

2.3. Revisión histórica del tema en estudio

En 1877 el botánico y micólogo Karl Otto Harz acuñó por primera vez el término de actinomicetos cuando aisló de un bovino una bacteria llamada *Actinomyces bovis* los cuales padecían actinomicosis, por lo que Karl pensaba que se trataba de un hongo debido a sus características morfológicas, luego en 1940 Selman Waksman descubrió de cepas de actinobacterias la actinomicina un potente antibiótico para otras bacterias resistentes de la época (Arenas y Torres, 2020).

De la misma manera, en otras investigaciones realizadas (Junfeng, *et al.*, 2008) que buscaba estudiar la capacidad de 7 cepas de actinobacterias para la colonización de raíces y los efectos inductores de las cepas sobre las actividades de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y polifenol oxidasas PPO en las hojas de pimiento encargadas de la síntesis de compuestos antimicrobianos de las plantas y oxidación de los frutos respectivamente.

Como resultado de este estudio se obtuvo que, en los tratamientos con las cepas inoculadas individualmente, cinco cepas dieron como resultado un aumento de la actividad de PAL en las hojas de pimiento, todas las cepas de prueba pudieron aumentar la actividad de la PPO y cinco cepas pudieron aumentar sincrónicamente las actividades de las dos enzimas.

Según Reyes *et al.*, (2017) en su investigación que tuvo como objetivo evaluar la promoción del crecimiento vegetal y la bioprotección contra la marchitez creada por *P. capsici* en plantas de pimiento mediante el efecto de coinoculación de hongos formadores de micorrizas

arbusculares (HMA) y actinobacterias, demostró que la sinergia de estos dos tipos de microorganismos en el pimiento incrementaron el crecimiento vegetal y la biomasa fresca y seca de las plantas así como también la severidad de la enfermedad se vio reducida.

En otra investigación (Suryanto *et al.*, 2017) se analizó la capacidad de PGPB de aislamientos locales para solubilizar fosfato, producir ácido indolacético (IAA) y evaluar el aislamiento para controlar enfermedades fúngicas y mejorar la productividad del chile y se obtuvo que para la producción de AIA, una fitohormona que promueve el crecimiento vegetal.

La cepa de actinobacteria Sp 10R produjo una cantidad relativamente más alta que el resto de los tratamientos. De la misma forma la cepa Sp 10R demostró una mayor protección contra patógenos en las plantas de la misma forma también se apreció una mayor altura de la planta, mayor peso fresco y seco del fruto.

Otras investigaciones realizadas en tomate mostraron que la inoculación con catorce diferentes cepas de actinobacterias seleccionados mejoró el crecimiento de la planta, mejorando sus características morfofisiológicas. También se observaron buenos resultados en cuanto a la producción de AIA, y la solubilización de fosfato (Djebaili *et al.*, 2020)

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La ejecución del proyecto se efectuó en los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología y vivero del Campus Universitario “La María”, propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo localizada en el Km 7 1/2 de la vía Quevedo – El Empalme con coordenadas: 79° 30’ 8”, longitud Oeste y 01° 04’ 51” de latitud Sur, altitud 67 msnm.

3.2. Tipo de investigación

La investigación realizada fue del tipo experimental, con la realización de ensayos en condiciones controladas donde se inocularon cepas de actinobacterias en semillas y plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) para probar el efecto que tienen en la germinación y el desarrollo fisiológico de las plantas.

3.3. Método de investigación

Dentro de esta investigación se usó el método de observación para todos los procesos que se realizaron, el inductivo para tratar desde los aspectos generales hasta los específicos lo cual permitió revisar aspectos del crecimiento de las plantas de pimiento y crecimiento de las actinobacterias, también se usó el método deductivo para identificar los efectos de las PGPR, actinobacterias, en las plantas de pimiento, y finalmente el método analítico mediante el cual se interpretaron los resultados obtenidos en la evaluación de las variables establecidas.

3.4. Fuente de recopilación de información

Se utilizaron fuentes de información primaria que surgieron a partir de la observación y recolección de datos de la propia investigación y secundarias como son: manuales, documentos, revistas científicas entre otros que permitieron recopilar datos actualizados y referentes a la investigación.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Tratamientos

Para la realización de la investigación se utilizaron los tratamientos detallados en la tabla 2.

Tabla 2

Descripción de los tratamientos con actinobacterias rizosféricas

Tratamientos	Descripción
T1	Cepa de actinobacteria 1
T2	Cepa de actinobacteria 2
T3	Cepa de actinobacteria 3
T4	Cepa de actinobacteria 4
T5	Control (Agua)

Elaboración. Autor

3.5.2. Diseño experimental

En la presente investigación se utilizó el Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con un total de 4 tratamientos y un grupo control con 3 réplicas con un total de 30 unidades experimentales, esto fue tanto para el experimento *in vitro* de germinación con las semillas en cajas Petri como para el experimento con las plantas *in vivo* (Tabla 3).

Tabla 3

Esquema de análisis estadístico

Fuente de variación		Grados de libertad	
Tratamientos	(t - 1)	(5-1)	4
Error experimental	t (r- 1)	5(3-1)	10
Total	(tr - 1)	(15-1)	14

Elaborado: Autor

3.6. Instrumentos de investigación

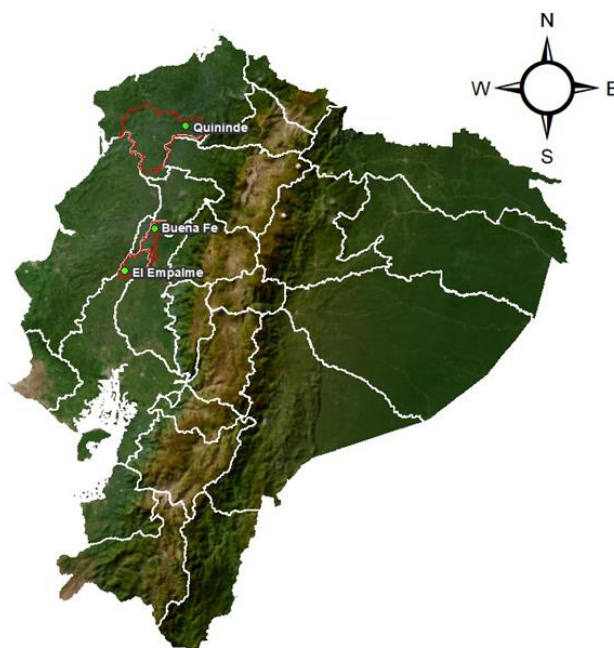
3.6.1. Manejo del experimento

3.6.1.1. Toma de muestras de suelo rizosférico.

Para la investigación se realizaron toma de muestras de suelo de diferentes partes del Ecuador entre los meses de enero y abril del año 2023 de la región costa: Provincia del Guayas, cantón El Empalme, Parroquia Velasco Ibarra, Provincia de los Ríos, cantón Buena Fe, sector La Alegría del Condor, Provincia de Esmeraldas, cantón de Quinindé, sector Las Golondrinas (Figura 1).

Figura 1

Mapa del Ecuador con los puntos estratégicos de muestreo de suelo



Se recolectaron, aleatoriamente, las muestras a 20 cm de profundidad de diferentes rizosferas como el cacao, aguacate y guaba. Se obtuvieron 200 g de tierra conformado alrededor de las raíces de los cultivos, la misma que fue guardada en fundas de polietileno estériles y refrigeradas por 24 h hasta su procesamiento en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. La identificación de las cepas se logró mediante códigos de acuerdo con la localidad donde fueron encontradas (tabla 4).

Tabla 4*Lugar de procedencia de las actinobacterias y código*

Provincia	Cantón	Coordenadas	Cultivo	Código
Guayas	El Empalme	X 649227,295823 Y 9877971,204933	Cacao	GC
Los Ríos	Buena Fe	X 658581,838738 Y 9861265,221258	Aguacate	BA
Esmeraldas	Quinindé	X 698919,210309 Y 9961265,2211258	Cacao	EM

Elaborado: Autor

3.6.1.2. Aislamiento de actinobacterias.

Para la obtención de las cepas se hizo un muestreo de suelo en cada una de las zonas seleccionadas y cada muestra luego fue transportada y procesada en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Campus Universitario “La María”.

Para el procesamiento de las muestras de suelo estas fueron esparcidas sobre una superficie plana y en un espacio cerrado durante 24 h, luego se pesó 1g de suelo seco y se mezcló en 9ml de agua destilada estéril, esta mezcla fue agitada por 15 min a 150 rpm. Luego se prepararon tubos eppendorf, previamente esterilizados con 900 µL de agua destilada estéril y 10 µL de la solución con las muestras de suelo, para realizar diluciones desde la 10^1 hasta la 10^5 .

Para la siembra de las diluciones se preparó medio específico para actinobacterias agar extracto de malta y levadura International Streptomyces Project (ISP2) con los siguientes reactivos: bacto-malt extract 10.0 g /L, bacto-yeast extract 4.0 g/L, bacto-dextrose 4.0 g/L, agua destilada 1L, agar-agar 20.0 g/L con un pH ajustado a 7.0 y fue esterilizado en autoclave y sembrado en placas Petri de plástico estériles.

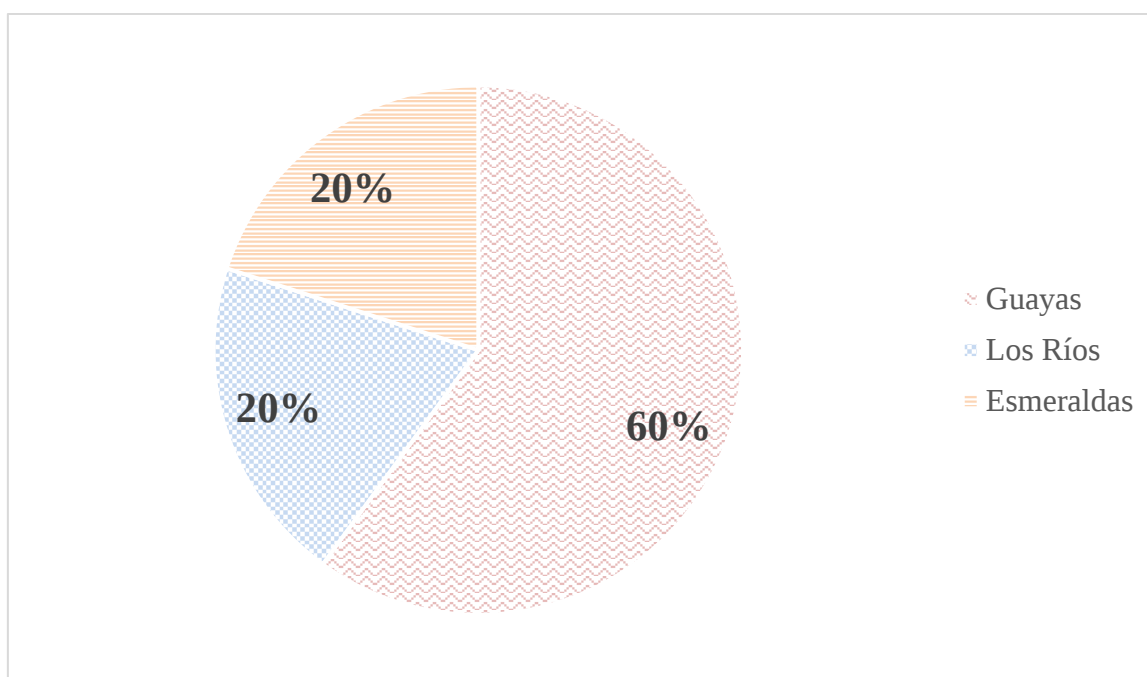
En la cabina de flujo se vaciaron de 10 a 15 ml del medio de cultivo ISP2 en cada placa Petri y se colocó luz ultravioleta durante 10 min, luego de solidificarse el medio se sembraron

20µL de la dilución de cada muestra y fueron distribuidas por todo el medio con un asa Drigalski mediante el método de dispersión, se dejaron incubando a 28 °C durante 15 días y monitoreadas cada dos días (Anexo A).

Se obtuvieron un total de 20 cepas de diferentes cultivos como el aguacate, cacao, y guaba, en diferentes provincias del Ecuador, el Guayas, Los Ríos y Esmeraldas. Las colonias de actinobacterias presentaron diferencias entre cada una por lo que se obtuvo una variedad de morfología dependiendo del sitio de donde fueron recolectadas (Tabla 5), con un porcentaje mayoritario en la provincia del Guayas con un 60%, seguido de Esmeraldas y los Ríos con el 20% cada provincia (figura 2).

Figura 2

Porcentaje de recuperación de actinobacterias en diferentes zonas del Ecuador



3.6.1.3. Caracterización morfológica de las colonias.

De las placas Petri que se mantuvieron en incubación durante 15 días, se observaron y seleccionaron únicamente las colonias con características similares a las actinobacterias como son la textura polvosa, formación de estructuras filamentosas como hifas, pigmentación en el medio de cultivo con colores grises hasta cafés, y la presencia de geosminas (Anexo B).

Para la purificación de cada una de las colonias se utilizó el medio International Streptomyces Project (ISP2) suplementado con nistatina (50 µL/ml), cloranfenicol (50 µg/ml) y fosfomicina (50 µg/ml), para prevenir la aparición de hongos y bacterias no deseadas en el medio de cultivo. Las placas con las cepas purificadas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días.

3.6.1.4. Caracterización bioquímica tinción de Gram.

Se seleccionaron los cultivos de actinobacterias con colonias jóvenes no más de 7 días y con un asa bacteriológica se realizó un frotis sobre un portaobjetos y se fijó la muestra con fuego mediante un mechero de bunsen. Posteriormente se agregaron los reactivos para la tinción de Gram, las que presentan color rojo son Gram negativas y las que presentan color violeta son Gram positivas.

En primer lugar, se tiñó la muestra con cristal violeta durante 1 min, luego se enjuagó con agua destilada estéril (ADE), después se colocó Lugol durante 1 min y se retiró el exceso con ADE luego se añadió alcohol para decolorar las bacterias durante 30 segundos y se enjuagaron, posteriormente se utilizó la safranina por 30 segundos para pigmentar las Gram negativas, y finalmente se dejó secar la muestra y se procedió a observar en el microscopio, para determinar que cepas eran positivas (Anexo C).

3.6.1.5. Prueba de catalasa.

Se utilizaron cepas puras y con células jóvenes de 7 días, con la ayuda de un asa y portaobjetos se colocó y fijó la muestra para luego colocar una gota de peróxido de hidrogeno H₂O₂ al 30% (v/v). El resultado se muestra como positivo cuando se observan burbujas sobre las colonias y si no se presentan es negativo (Anexo D).

3.6.1.6. Reactivación de actinobacterias.

En condiciones asépticas y en una cámara de flujo laminar se prepararon las cajas Petri, se añadió el medio de cultivo International Streptomyces Project (ISP2). Con la finalidad de preparar el pre-inoculo, posteriormente cuando el medio se solidificó se añadió las cepas de

las actinobacterias. Estas fueron llevadas a la incubadora y monitoreadas por 5 días a una temperatura de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.6.1.7. Preservación de actinobacterias.

Las actinobacterias fueron conservadas por triplicados en tubos Eppendorf con la utilización del medio de cultivo ISP2 con la incorporación de glicerina en relación 8:2, 800 μl de medio líquido (sin agar) y 200 μl de glicerina.

3.6.1.8. Obtención de fermentos.

Se utilizaron colonias puras de actinobacterias en placas Petri y estas fueron sembradas en caldo de levadura y glucosa: bacto-malt extract 10.0 g /L, bacto-yeast extract 4.0 g/L, bacto-dextrose 4.0 g/L, agua destilada 1L y se colocaron en matraces con 75ml los cuales se dejaron en una agitadora a temperatura ambiente durante 15 días a 150 rpm.

Posteriormente para obtener el sobrenadante de la fermentación se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min tres veces para separar la fase solida de la liquida descartando la sólida, luego se realizó choque térmico del sobrenadante dejando el centrifugado a -20°C durante 15 min y luego colocado en baño maría a 60°C durante 15 min y repitiendo el proceso 3 veces hasta dejar el sobrenadante libre de células (Anexo E).

3.6.1.9. Desinfección de semillas de pimiento (*C. annuum*).

Las semillas de pimiento fueron embebidas en 70% de etanol por 30 segundos, luego fueron enjuagadas con agua destilada. Posteriormente las semillas fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 3% por 30 segundos, finalmente se enjuagaron 6 veces con agua destilada estéril.

3.6.1.10. Inoculación de semillas de pimiento (*C. annuum*).

Para la inoculación se colocaron en placas Petri 10 semillas desinfectadas previamente y fueron embebidas con la suspensión microbiana durante 20 minutos, luego se incubarán a 25°C por un día, después fueron trasladadas a un cuarto oscuro para evaluar el porcentaje de germinación y longitud de radícula *in vitro* (Anexo F).

3.6.1.11. Siembra.

Las semillas tratadas con la solución de actinobacterias y pregerminadas fueron sembradas en fundas plásticas. Se colocó una semilla por funda a una profundidad de 0.5 cm, se preparó el sustrato con turba, tierra fértil y perlita estéril en una proporción de 1:1:1/2, respectivamente, y finalmente se establecieron en un invernadero bajo condiciones controladas (Anexo G).

3.6.1.12. Re-inoculación.

Las plantas de pimiento fueron re-inoculadas con cepas de actinobacterias a los 15 días (1.5ml/planta) y 30 días (3ml/planta) después de la siembra con la finalidad de aumentar la carga microbiana en el suelo, esta inoculación se realizó a nivel edáfico en todas las plantas de todos los tratamientos incluyendo el control (Agua).

3.6.2. Variables evaluadas

3.6.2.1. Morfología de las cepas de actinobacterias.

Para visualizar la morfología que presentan las actinobacterias estas se dejaron incubando durante 7 días en medio de cultivo específico ISP2 con agar y fueron determinados en base a la tabla de caracteres bacteriológicos.

3.6.2.2. Caracterización bioquímica.

Para evaluar esta variable se hicieron pruebas de tinción de Gram para seleccionar las cepas que presentaban coloración violeta en sus estructuras como respuesta de las células Gram positivas. Así mismo se seleccionaron colonias de actinobacterias jóvenes y las que presentaron reacción de burbujas en la prueba fueron seleccionadas como positivas para la prueba de catalasa.

3.6.2.3. Porcentaje de germinación (%).

El porcentaje de germinación fue evaluado a los 10 días en lo cual se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas de pimiento desde el primer día hasta el día 10 después de la siembra en las placas, para la evaluación se tomaron las 3 repeticiones por tratamiento y se determinó el porcentaje de germinación promedio (Rivas, 2022).

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje:

$$G\% = \frac{N}{N_s} * 100$$

Donde G es el porcentaje de semillas germinadas, N las semillas germinadas que fueron tratadas y Ns el total de semillas utilizadas por 100.

3.6.2.4. Índice de velocidad de emergencia (IVE).

Se evaluaron las plantas diariamente durante 14 días y el índice fue calculado según la fórmula propuesta por Marguire, (1962) la cual expresa lo siguiente:

$$IVE = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{N_i}$$

En donde IVE es el índice de velocidad de emergencia, Xi = Número de plantas emergidas por día, Ni= Número de días después de la siembra y n es el número de conteos.

3.6.2.5. Altura de la planta (cm).

La altura de las plantas fue tomada a los 45 días después de la siembra. Se tomaron datos de todas las plantas de cada repetición y cada uno de los tratamientos. Para medir la altura se utilizó un flexómetro y estas fueron medidas desde la base del tallo hasta el punto más alto del ápice de cada planta (Anexo H).

3.6.2.6. Número de hojas.

El número de hojas se contó a los 45 días después de la siembra y se tomaron en cuenta los cotiledones y las hojas verdaderas totales que tenía cada una de las plantas en los 5 tratamientos y cada una de las repeticiones.

3.6.2.7. Diámetro del hipocótilo (mm).

Para medir el diámetro se utilizó un calibrador Vernier y se tomó los datos de todas las plantas de cada repetición desde la base del tallo de cada una (Anexo H).

3.6.2.8. Longitud de la radícula.

Se retiró de manera delicada todo el sustrato en el que estaban las plántulas de pimiento y se dejaron expuestas las raíces de toda la tierra, se utilizó un flexómetro y cada raíz se midió desde la base del cuello de la radícula hasta la extensión más larga de la misma (Anexo H).

3.6.2.9. Número de raíces secundarias.

Todas las raíces de las plantas fueron retiradas y limpiadas del sustrato luego desde la base de la raíz principal se midió 1cm y se contaron las raíces secundarias que se seccionaban desde ahí.

3.6.2.10. Peso del hipocótilo (g).

Se llevó a cabo luego de haber evaluado todas las variables a los 45 días después de la siembra, la evaluación se la realizó en todas las unidades experimentales de cada repetición. Se utilizó hojas y tallos de las plantas, las raíces fueron removidas con un corte recto transversal con un bisturí, y finalmente para obtener el peso se usó una balanza analítica.

3.6.2.11. Peso radicular.

Para obtener el peso radicular en gramos tomamos las raíces que le fueron retiradas de las plantas con total cuidado, primero se realizó un enjuague sumergiendo las raíces en una

fuelle con agua para retirar restos de tierra de manera cuidadosa evitando que se dañe la raíz, y luego estas fueron pesadas en una balanza analítica.

3.7. Tratamiento de los datos

Los resultados de las variables fueron sometidos al análisis de varianza ADEVA para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos y sometidos a la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Previamente los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza con el software InfoStat.

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Recursos humanos

Estudiante responsable de la investigación, docente guía y director del proyecto.

3.8.2. Material vegetal

Se utilizaron semillas de pimiento (*Capsicum annuum*) híbrido Quetzal (seminis) obtenidas de la casa comercial AGRIPAC®

3.8.3. Material genético

Diferentes cepas de actinobacterias aisladas y caracterizadas de distintas zonas de la provincia de Los Ríos, Guayas y Esmeraldas las cuales fueron aisladas y caracterizadas desde la rizosfera de suelos con cultivos como cacao, aguacate y guaba. Se utilizaron las cepas BA, EM, GC2 y GC4.

3.8.4. Material de laboratorio

Para los diferentes experimentos se utilizaron los siguientes materiales: Cajas Petri, papel toalla, juego de micropipetas, frascos de vidrio, tubos de Eppendorf, botellas esterilizables, guantes quirúrgicos, medio ISP2, agua destilada.

3.8.5. Equipo de laboratorio

Balanza analítica, autoclave, cabina de flujo, destilador de agua, centrifuga, calentador, microscopio, estereoscopio, espectrofotómetro y baño maría.

3.8.6. Material de vivero

Dentro del vivero para establecer los tratamientos se utilizaron los siguientes materiales: Vasos plásticos de 32 oz, regaderas, sustrato, balanza, calibrador y flexómetro.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

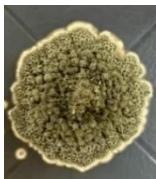
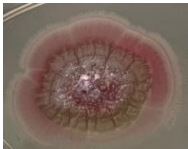
4.1. Resultados

4.1.1. Morfología de las cepas de actinobacterias

Las colonias de actinobacterias presentaron diferencias entre cada una por lo que se obtuvo una variedad de morfología dependiendo del sitio de donde fueron recolectadas (tabla 5).

Tabla 5

Características morfológicas de las cepas de actinobacterias

Código	Vista macroscópica	Color	Textura
BA		Amarilla y blanco	Polvosa y presenta geosminas
EM		Café	Rugosa
EM2		Verde oscuro	Polvosa y presenta geosminas
EM3		Gris	Seca, granular
GC1		Blanca	Algodonosa, con geosminas
GC2		Roja	Seca, filamentosa
GC3		crema	Seca, rugosa

GC4		Gris	Algodonosa, con geosminas
GG		Blanca	Seca, cremosa, bordes irregulares

Nota: Descripción de las características morfológicas de las cepas de actinobacterias (BA, EM, EM2, EM3, GC, GC1, GC2, GC3, GC4, GG).

Elaborado: Autor

4.1.2. Caracterización bioquímica

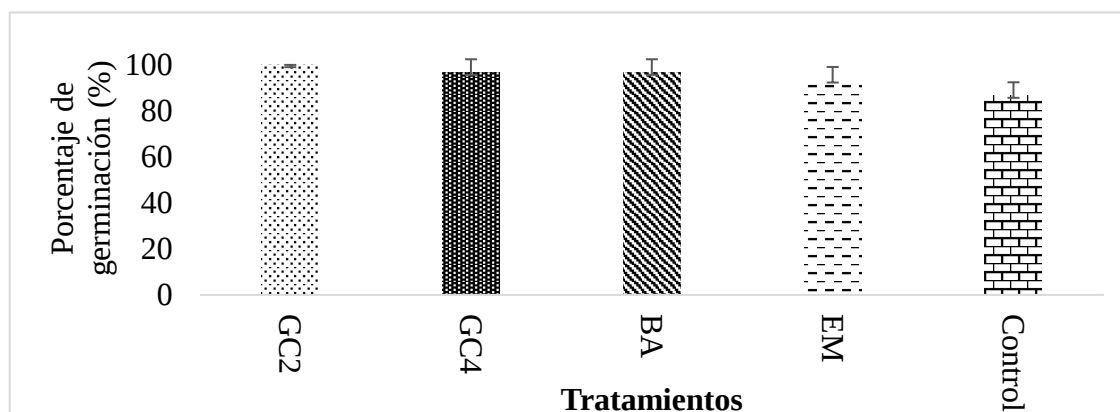
Mediante las pruebas realizadas se verificó que todas las cepas dieron como positivo en la tinción de Gram es decir todas presentaron pigmentación violeta, esto debido a su pared celular y la distribución de los peptidoglucanos que se encuentran en ella las positivas al tener una mayor densidad de estas moléculas permite que el color se concentre y la célula quede pigmentada del color violeta característico. Todas las cepas presentaron la capacidad de hidrolizar el peróxido de hidrógeno y dieron como positivo ante la actividad de la enzima catalasa.

4.1.3. Porcentaje de germinación

En el experimento sobre el porcentaje de germinación en las semillas inoculadas por las cepas de actinobacterias, tuvo un coeficiente de variación de 5.45 y se demostró que no obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (figura 3).

Figura 3

Porcentaje de germinación de semillas de pimienta



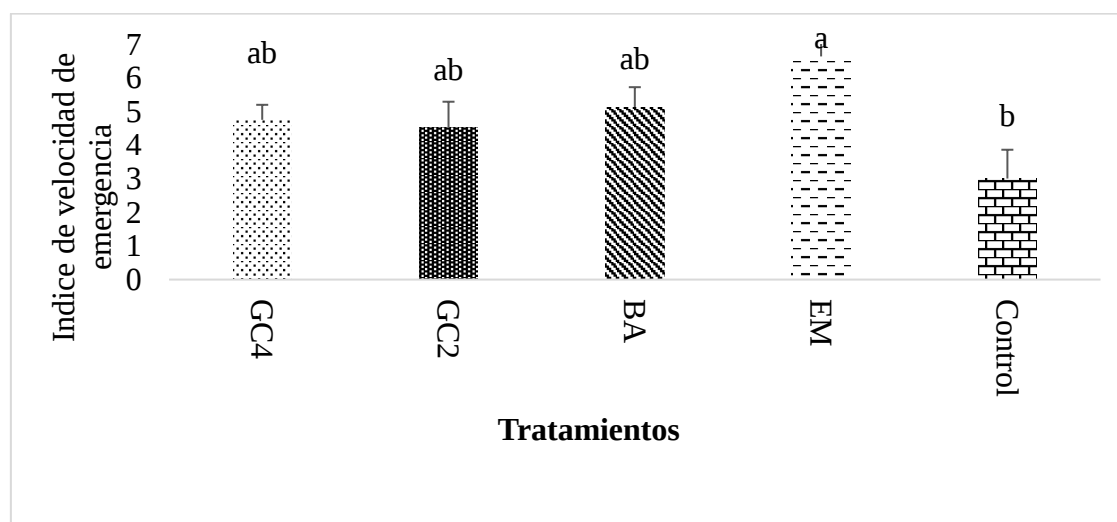
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar

4.1.4. Índice de velocidad de emergencia

Las semillas que fueron inoculadas con las cepas de actinobacterias presentaron diferencias significativas entre en el índice de velocidad de emergencia respecto al control. La cepa EM obtuvo el mayor valor (6.65) seguido de la cepa BA (5.14), GC4(4.76), y GC2 (4.52), mientras que el control de las semillas inoculadas con agua obtuvo el menor valor de 3.01 (figura 4).

Figura 4

Índice de velocidad de emergencia en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias



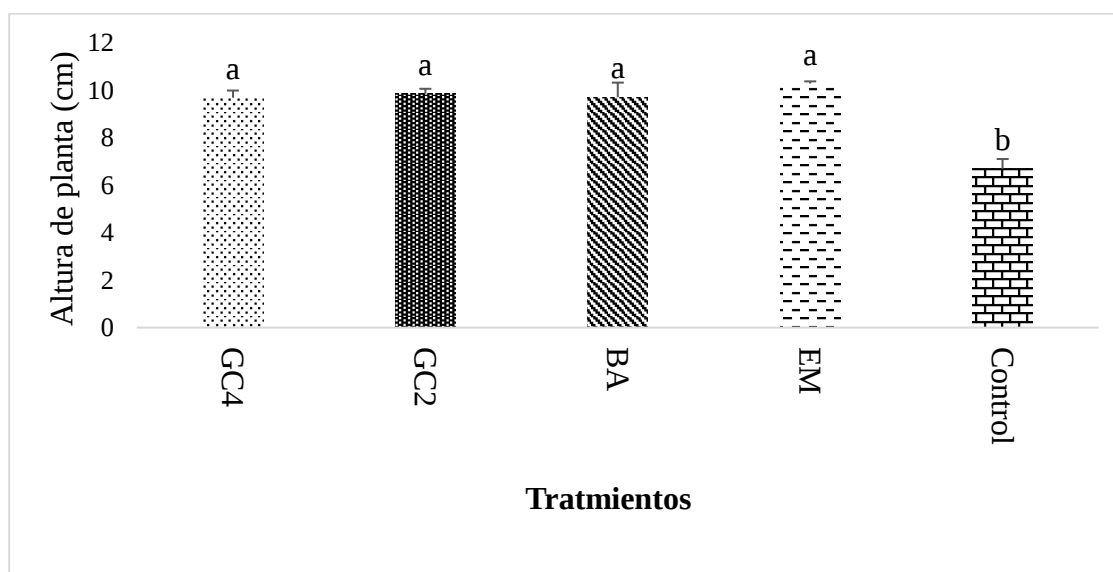
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre cada tratamiento $P < 0.05$ Tukey.

4.1.5. Altura de planta

Se registró un mayor crecimiento en las plantas tratadas con las cepas de actinobacterias EM, BA, GC2 Y GC4 que obtuvieron un promedio de 9.88 en comparación con el grupo de control que obtuvo un valor de 6.69, el cual solo recibió agua y cuyo crecimiento no logró igualar ni superar el de las plantas inoculadas (figura 5).

Figura 5

Altura de las plantas de pimiento inoculadas con actinobacterias



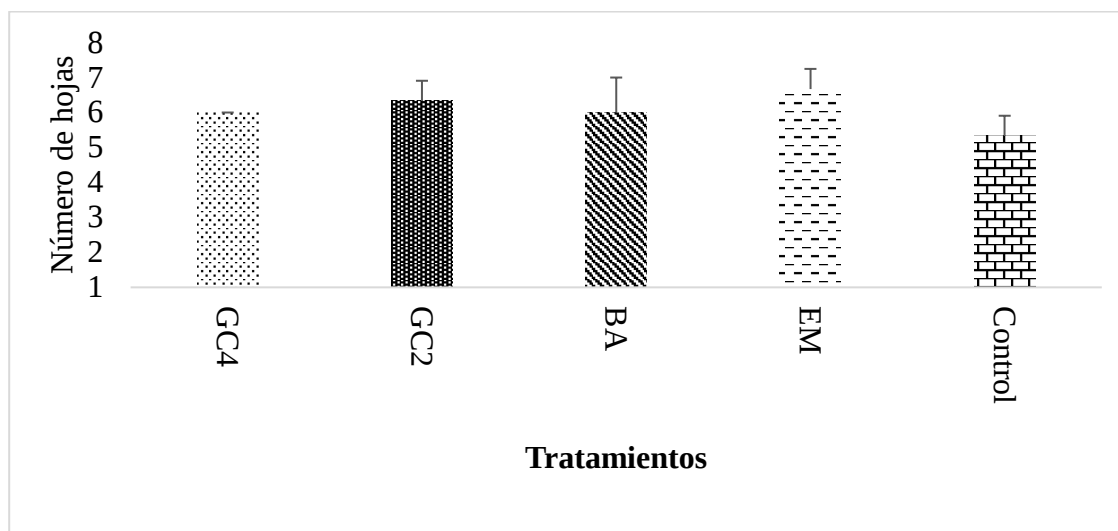
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes. Tukey ($p > 0,05$).

4.1.6. Número de hojas

En cuanto al número de hojas emitidas por las plantas no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, durante el tiempo que duró la evaluación de las plantas, el uso de actinobacterias como bioestimulantes no promovió una mayor emisión de hojas en este caso. Sin embargo, el tratamiento GC4 obtuvo la mayor media con un valor de 7 hojas mientras que el control la menor media de 5 hojas por planta (figura 6).

Figura 6

Número de hojas en plántulas de pimienta inoculadas con actinobacterias



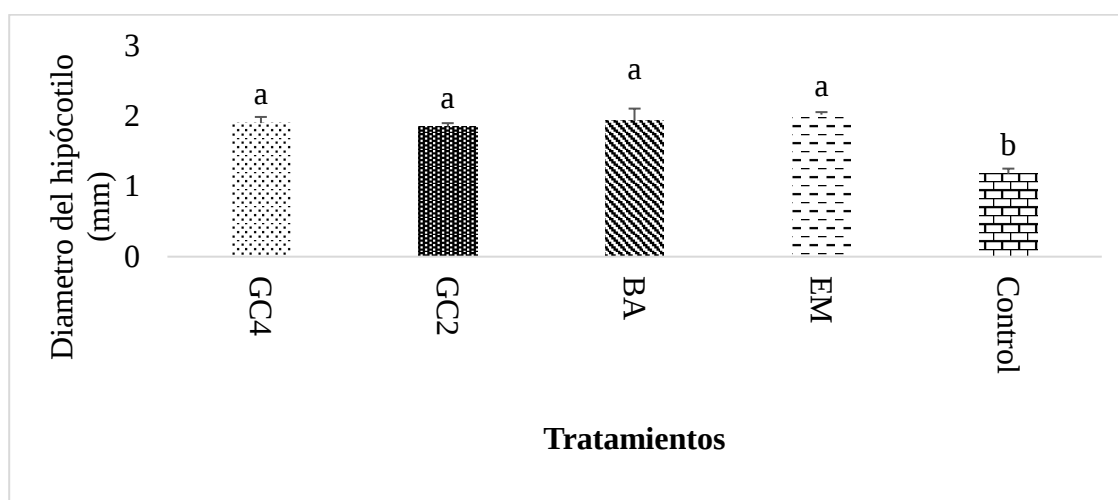
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Tukey ($p > 0,05$).

4.1.7. Diámetro del hipocótilo

Se identificó que la aplicación de actinobacterias en plántulas de pimienta lograron efectos bioestimulantes sobre el diámetro del hipocótilo, donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con un promedio de 1.93 mm para las plantas inoculadas, mientras que el tratamiento control obtuvo una media de 1.18 mm (Figura 7).

Figura 7

Diámetro del hipocótilo en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias



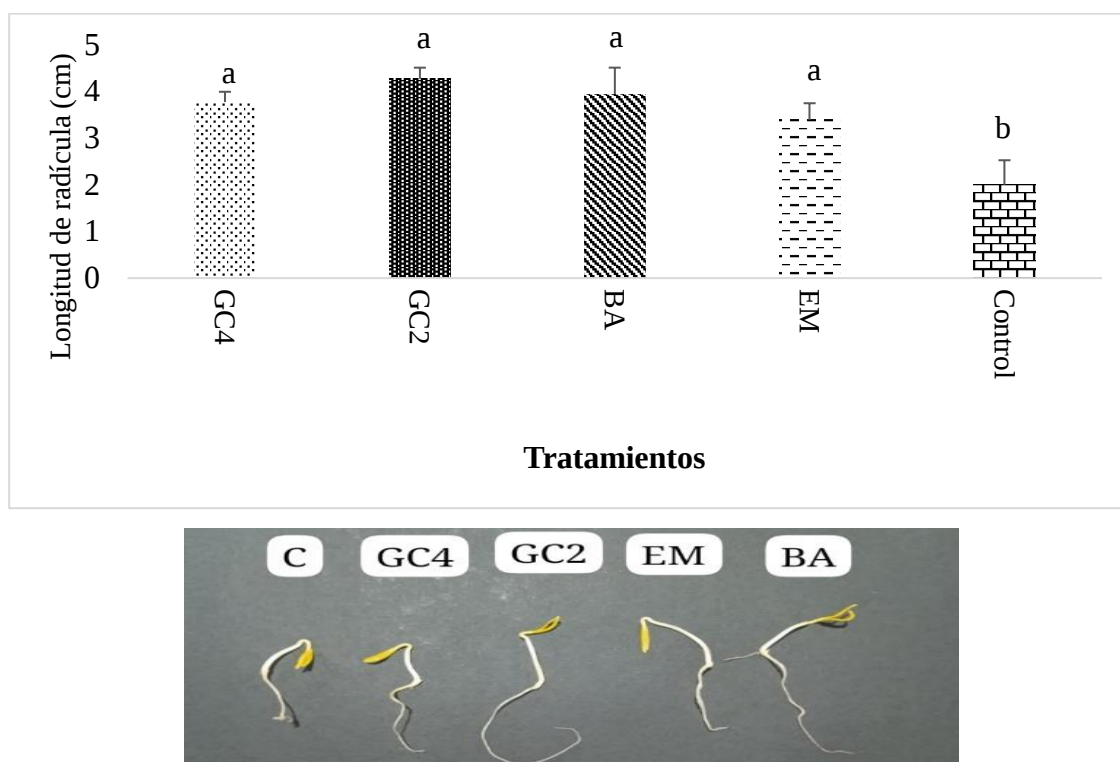
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes. Tukey ($p > 0,05$).

4.1.8. Longitud de la radícula en semillas de pimienta

Las cepas de actinobacterias presentaron efectos bioestimulantes en el crecimiento radicular, y se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El crecimiento de la raíz de las semillas de pimienta fue promovido por el efecto de la inoculación de las actinobacterias, generando un coeficiente de variación de 11.74%, (figura 8).

Figura 8

Longitud de radícula en semillas de pimienta in vitro



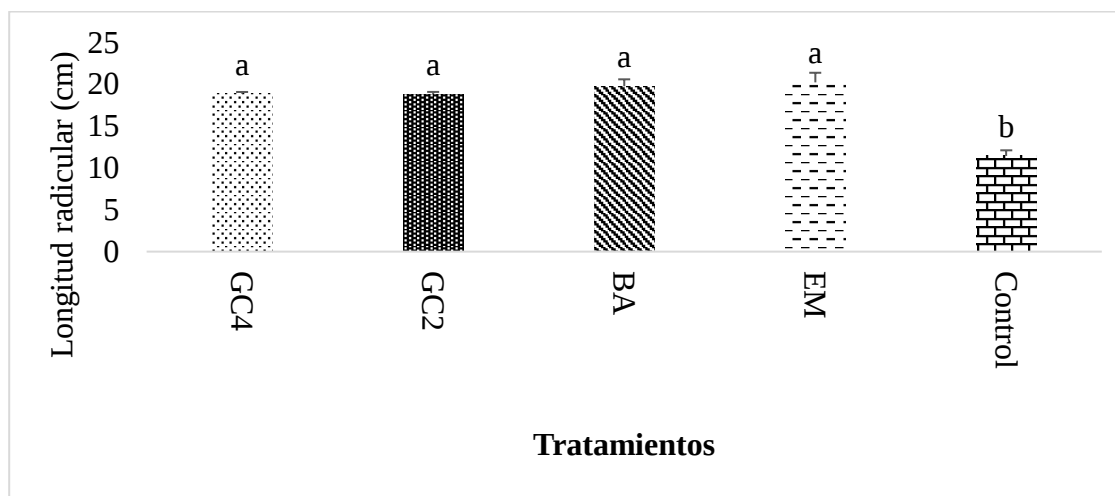
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre cada tratamiento $P < 0.05$ Tukey.

4.1.9. Longitud radicular en plantas de pimienta

Las cepas de actinobacterias inoculadas en plantas de pimienta demostraron tener efectos sobre la estimulación del crecimiento del sistema radicular de las plantas, con diferencia significativa entre los tratamientos, y un coeficiente de variación de 4.02 (figura 9).

Figura 9

Longitud radicular en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias



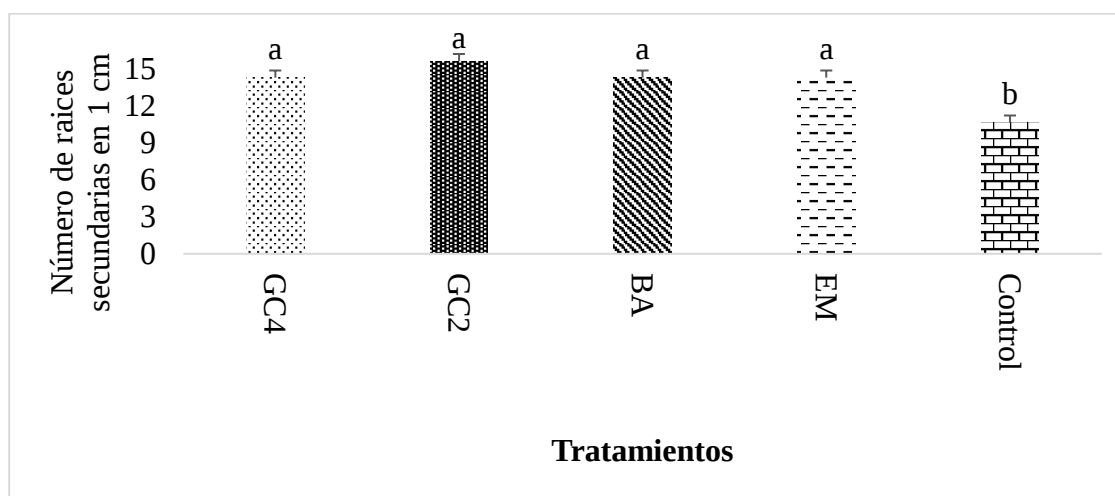
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes. Tukey ($p > 0,05$).

4.1.10. Número de raíces secundarias en 1cm

Entre los tratamientos inoculados con las cepas de actinobacterias tuvieron una buena estimulación en las plantas, pero si se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, con un coeficiente de variación de 4.16 y un promedio entre las plantas inoculadas de 14 mientras que el control de 11 (figura 10).

Figura 10

Nº de raíces secundarias en 1 cm en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias



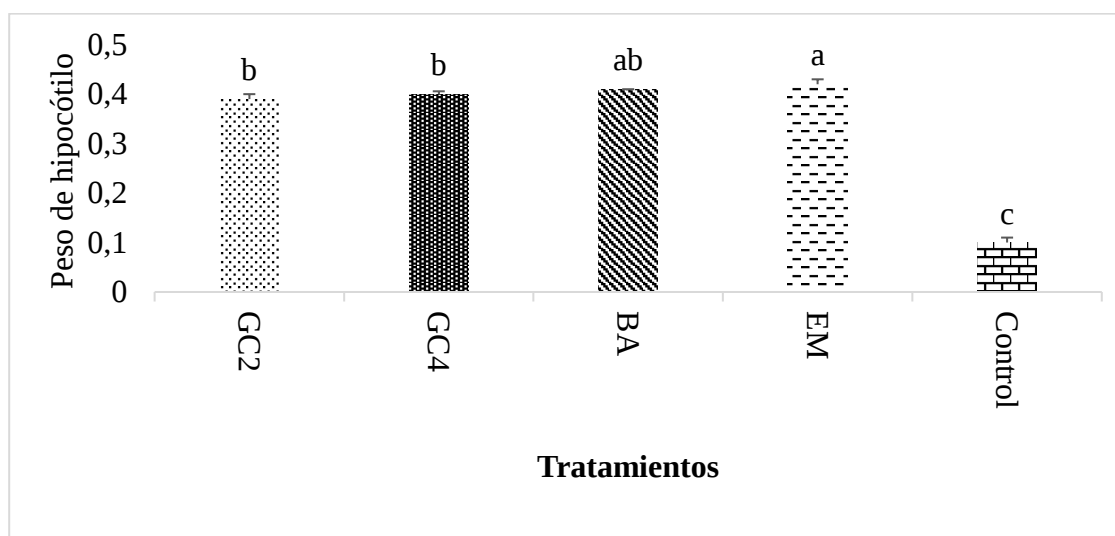
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes. Tukey ($p > 0,05$).

4.1.11. Peso del hipocótilo

Los resultados obtenidos en el peso del hipocótilo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. EM tiene un mayor potencial ya que obtuvo la media de 0.42 g siendo el valor más alto, seguido de la cepa BA con la media de 0.41 g mientras que el valor más bajo lo obtuvo el tratamiento control con una media de 0.10 g (figura 11).

Figura 11

Peso del hipocótilo en plantas de pimienta inoculadas con actinobacterias



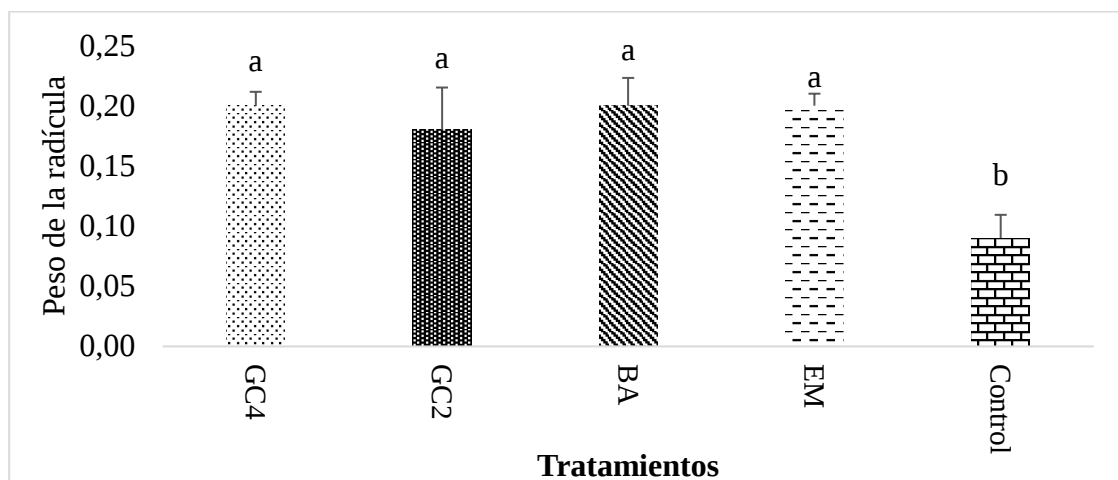
Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes. Tukey ($p > 0,05$).

4.1.12. Peso de la radícula

La aplicación de las actinobacterias en las plantas de pimienta mostró tener un efecto estimulante en el crecimiento radicular de las plantas, se obtuvieron diferencias significativas con las cepas utilizadas como tratamientos respecto al agua utilizada como control, Las cepas EM, BA, GC2 y GC4 obtuvieron los mayores resultados con una media de 0.20 g mientras que el tratamiento control mostró resultados con valores de 0.09 g (figura 12).

Figura 12

Peso de la radícula en plantas de pimiento inoculadas con actinobacterias



Nota: Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes. Tukey ($p > 0,05$).

4.2. Discusión

Las actinobacterias conforman uno de los grupos más grandes e importantes de los microorganismos del suelo, estas son encontradas en distintas condiciones ambientales, ya sean en suelos con abundante materia orgánica, suelos en proceso de formación o contaminados con materiales inorgánicos (Quiñonez, *et al.*, 2016). La mayor parte de actinobacterias son encontradas en suelos con cobertura vegetal en bosques, debido a las características ambientales que estos otorgan para su desarrollo y se las encuentra principalmente entre los 20 y 30 cm de profundidad (Cardona, *et al.*, 2009).

Dentro de la investigación se aislaron una cantidad de 20 actinobacterias de distintas zonas del Ecuador como Esmeraldas, Guayas y Los Ríos. Las colonias de actinobacterias presentaron diferentes morfologías en cuanto a color, formas y texturas. Guevara (2017) reportó en su estudio que aisló 12 cepas de actinobacterias y las colonias presentaron morfologías muy variadas, similares a las observadas en esta investigación.

Las variaciones de morfología presentes en este estudio pueden ser debido a que las actinobacterias son de los microorganismos con mayor biodiversidad endofíticas y son capaces de vivir en diversos tipos de ambientes desde suelos contaminados hasta suelos con mucha vegetación (Quiñonez, *et al.*, 2016). Las cepas obtenidas en esta investigación provienen de diferentes provincias y diferentes cultivos según Torsvik *et al.*, (1996) sugiere que mientras haya una mayor variación de microhábitats la variabilidad en la morfología de los microorganismos será mucho mayor, debido al tipo de vegetación, y características del suelo rizosférico.

Salazar y Ordóñez (2013) reportaron de sus aislados de actinobacterias que fueron obtenidas de bosques, presentaron características morfológicas con colonias secas polvosas y con coloraciones cafés y blancas similares a las descritas en esta investigación con cepas de crecimiento filamentoso con coloraciones cafés, grises, blancas, verde, roja y amarilla con texturas secas, polvosas, rugosas y cremosas. En otra investigación realizada por Cardona, *et al.* (2009) se identificaron 16 morfotipos de actinobacterias mayormente para el género *Streptomyces* y *Nocardia* con colonias filamentosas circulares, opaca y compactas, estas son características similares presentadas en las cepas EM, EM2, GC2 y GG.

Al realizar las pruebas bioquímicas de catalasa para todas las actinobacterias dieron como resultado positivo todas las cepas, esto es debido a que la mayoría de las especies de actinobacterias son aerobias estrictas y poseen citocromos, por lo tanto, tienen la capacidad para descomponer peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, lo cual da como resultado con la formación de burbujas y se interpreta como reactivo positivo para catalasa según (Fernández, *et al.*, 2010).

Casasola (2022) indica que los microorganismos que poseen una pared celular con una gruesa capa de peptidoglucanos tienen la capacidad de retener el pigmento violeta entre sus estructuras, dando la coloración típica de los microorganismos Grampositivos. En esta investigación se realizaron pruebas de tinción de Gram y se observó a nivel microscópico actinobacterias con estructuras filamentosas de color violeta indicativo de ser Grampositivas en todas las cepas seleccionadas.

Las actinobacterias han demostrado tener un potencial como bioestimulantes en plantas de pimiento mejorando su desarrollo y crecimiento vegetativo tal como evidenció Reyes *et al.*, (2017). De acuerdo con esto, en esta investigación se seleccionaron las actinobacterias con mayor promoción del crecimiento, se hicieron pruebas para evaluar el efecto sobre la germinación y crecimiento de la radícula *in vitro* de las semillas de pimiento. Los resultados demostraron que las actinobacterias funcionan como estimulantes en el crecimiento de la raíz demostrando una mayor longitud en las semillas inoculadas con las cepas, sin embargo para la germinación no fue estadísticamente diferente, resultados similares reportó Pacheco (2016) en donde aislados del género *Streptomyces* influyeron en el crecimiento de la raíz generando una mayor longitud en *Lactuca sativa* (lechuga) y *Medicago sativa* (alfalfa), por lo contrario para la germinación no manifestó diferencias significativas.

Según la investigación de Sánchez *et al.* (2019) en donde aplicaron 3 cepas distintas de actinobacterias, obtenidas de muestras de suelos cultivados y no cultivados en plantas de *Capsicum annuum*, produjo un incremento en los valores de altura de plantas respecto al control utilizado. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron dentro de esta investigación en donde las plantas de pimiento inoculadas con actinobacterias tuvieron una mayor elongación del hipocótilo a diferencia de las del control donde la cepa EM obtiene los valores más altos para esta variable. Arcos *et al.*, (2021) demostró resultados similares en su investigación donde empleó 3 cepas de actinobacterias frente a un testigo comercial,

y en la evaluación para la altura de planta las que fueron inoculadas con los microorganismos dieron los valores más altos a diferencia del testigo.

Por otro lado, según los resultados de Lassevich *et al.*, (2020) demostró que en un bokashi en donde la presencia de la mayor parte de los microorganismos pertenecía a las actinobacterias generaron un mayor peso fresco en la parte aérea y la parte radicular de plantas de lechuga respecto al control dando como resultado una mayor generación de biomasa en las plantas, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación en donde las plantas inoculadas con actinobacterias principalmente en las cepas EM y GC4 generaron un mayor peso del hipocótilo y la rizosfera respectivamente, a diferencia del control, esto se debe a la capacidad que algunas actinobacterias poseen para producir poliaminas e influir en las rutas de las auxinas lo cual ayuda en la generación de una interacción bacteria-planta mucha más efectiva y rápida (Martínez, 2022). Y el ácido indolacético que es la auxina más común tiene una participación importante en la división celular de las plantas, favoreciendo así su crecimiento y desarrollo radicular, (Franco, 2008).

El efecto promotor de las actinobacterias permitió un mayor crecimiento longitudinal en las raíces de las plantas inoculadas, destacando el tratamiento de la cepa GC2 así como también en el número de raíces secundarias en 1 cm donde la cepa GC2 es la que obtiene los valores más altos, lo cual puede estar asociado a la capacidad de las actinobacterias para estimular la producción de ácido indolacético en las plantas el cual interviene en los procesos de elongación y división celular según afirma Martínez (2022).

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se aislaron un total de 20 cepas de actinobacterias y se lograron caracterizar morfológica y bioquímicamente 9 cepas.
- Las actinobacterias no promovieron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de germinación en las semillas de pimienta, sin embargo, la cepa GC2 obtuvo el mayor valor.
- Las 4 cepas de actinobacterias seleccionadas para el estudio presentaron un potencial como bioestimulantes en el desarrollo *in vitro* en la longitud de la radícula de las semillas de pimienta donde la GC2 presentó mejores resultados. La aplicación de los fermentados de actinobacterias en plantas y semillas de pimienta promovieron una mejora en las características agronómicas de las mismas.

5.2. Recomendaciones

- Profundizar el estudio de las cepas BA, EM, GC2 y GC4 en etapas más avanzadas del cultivo para conocer sus beneficios hasta el final del ciclo de vida de la planta.
- Combinar las cepas de actinobacterias con otros microorganismos considerados PGPR para probar la sinergia entre ambos.
- Probar la aplicación de las actinobacterias a nivel de campo en otros cultivos de interés agrícola.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Angulo, A., Ferrera, R., Alarcón, A., Almaraz, J., Delgadillo, J., Jiménez, M., y García, O. (abril de 2021). Improved growth of bell pepper (*Capsicum annuum*) plants by inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial rhizobacteria. *Scientia Fungorum*, 51, 1-11. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1299>
- Arawan Shutsrirung, Y. C.-A., y Boonkerd, N. (junio de 2013). Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity, Soil Science and Plant Nutrition. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(3), 322-330. <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.776935>
- Arcos, B., Sánchez, B., Rodríguez, D., Lóez, R., y Guevara, L. (2021). Efecto de (*Trichoderma*), actinobacterias y ácido salicílico en la producción de chile de árbol. *Revista Tecnológica CEA*, 232-243.
- Arenas, R., y Torres, E. (2020). *Micología Médica Ilustrada*, 6e. McGraw Hill: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2791ysectionid=234753106>
- Armenta, A., García, C., y Camacho, R. (abril de 2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.
- Bhagat, Kumar, y Mahmood. (Febrero de 2020). Bell Pepper Leaf Disease Classification Using CNN. *Engineering and Applications*, 1(5), 1-5. <https://doi.org/10.1109/IDEA49133.2020.9170728>
- Caiza, M. G. (2017). *Evaluación del rendimiento de tres híbridos de pimiento (Capsicum annuum L.) a las condiciones agroclimáticas de la comunidad la clementina, parroquia Pelileo, cantón Pelileo, provincia de Tungurahua*. Universidad Técnica de Ambato.
- Cañarte, C., Fuentes, T., Vera, B., y Ayón, N. (2018). Producción y comercialización del pimiento e incidencia socioeconómica. *Polo del conocimiento*, 3(7), 238-252.
- Cardona, G., Peña, C., y Ruiz, M. (2009). Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Biología Tropical*, 57(4), 119-1139. <https://doi.org/10.15517/rbt.v57i4.5451>
- Casasola, J. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa*

- Rica, 27(2), 89-98. <http://revista.microbiologos.cr/wp-content/uploads/2022/08/Volumen-27-N%C2%BA2-Arti%CC%81culo-3-89-98.pdf>.
- Castro, J., Tuesta, C., Cisnero, J., Cabello, N., y Quispe, J. (Diciembre de 2019). Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena). *Ecología Aplicada*, 18(2). <https://doi.org/10.21704/rea.v18i2.1329>.
- Chen- Fan, S., y Yong-Quan, L. (Julio de 2020). Regulation of Protein Post-Translational Modifications on Metabolism of Actinomycetes. *Biomolecules*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/biom10081122>
- Ciju, R. J. (2021). *Pimientos Morrones: Prácticas de Cultivo y Valor Nutricional* (3 ed.). Murcia: Agrihortico.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Gallo, M. D., y Kitouni, M. (abril de 2020). Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/su12114617>
- Duche, G., Ocampo, F., y Cruz, H. (Marzo de 2021). Microbial groups in a milpa agroecosystem interclassified with fruit trees in high valleys of Puebla, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(2), 1-17.
- Espinosa, B., Moreno, A., Cano, P., Álvarez, V. d., Sáenz, J., Sánchez, H., y González, G. (junio de 2017). Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afrodita en invernadero. *Terra Latinoamericana*, 35(2), 169-178.
- Evangelista, Z., Quiñones, E., y Rincón, G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 39-51.
- Farm Bill. (12 de Abril de 2018). *Agriculture house*. https://agriculture.house.gov/uploadedfiles/agriculture_and_nutrition_act_of_2018.pdf
- Fernández, A., García, C., Saéz, A., y Valdezate, s. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Fornaris, G. (2015). *Características de la planta*. Retrieved 3 de Septiembre de 2022.

- Franco, M. (2008). *Evaluación de carteres PGPR en actinomicetos de interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Granada: Universidad de Granada.
- Gao, P., y Huang, Y. (Mayo de 2009). Detection, Distribution, and Organohalogen Compound Discovery Implications of the Reduced Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Halogenase Gene in Major Filamentous Actinomycete Taxonomic Groups. *American Society for Microbiology*, 75(14), 4813-4820. <https://doi.org/10.1128/AEM.02958-08>
- Gomez, F., Tejeda, O., y Telles, L. (Marzo de 2017). Lanthanum Affects Bell Pepper Seedling Quality Depending on the Genotype and Time of Exposure by Differentially Modifying Plant Height, Stem Diameter and Concentrations of Chlorophylls, Sugars, Amino Acids, and Proteins. *Frontiers in plant science*, 8, 308. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00308>
- González, T. (2010). *Los actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- González, P. (2019). *Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes*. Retrieved 1 de septiembre de 2022, desde Biblioteca del congreso nacional de Chile/ BCN: https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias_ambientales_de_la_aplicacion_de_fertilizantes.pdf
- Goswami, D., Thakker, J., y Dhandhukia, p. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food y Agriculture*, 2(1), 1-19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Guevara, B. (2017). *Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra Ralstonia solanacearum, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella sp.* Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- Ispizua, E. M., Cuenca, M. R., Marsal, J., Cerdal, J., Díez, M., Soler, S., . . . Calatayud, A. (Octubre de 2020). Caracterización nutricional de variedades nutricionales valencianas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Agrícola Vergel*(428), 209-215.
- Jose María, G., Milton, M., Carmen, C., y Jose, M. (December de 2010). Spiked pepper: selection of clones toward cropping on the edaphoclimatic conditions from Belém, Brazil. *Horticultura Brasileira*, 28(4), 418-423. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000400007>

- Junfeng, L., Quanhong, X., y Xiaolei, N. (abril de 2008). Root colonization and effects of seven strains of actinomycetes on leaf PAL and PPO activities of capsicum. *Journal of Northwest A&F University*, 25(10), 2118-2123.
- Khushboo, y Kaur, N. (marzo de 2020). Screening of Endophytic Actinomycetes for their Plant Growth Promoting Activity and for Biocontrol in Chilli (*Capsicum annum*) against *Sclerotium Rolfsii*. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 8(8), 1863-1890.
- Lassevich, D., Trasante, T., García, S., Platero, R., y Bajsa, N. (2020). Caracterización y evaluación agronómica de tres biopreparados: Bokashi, Supermagro y Microorganismos Eficientes Nativos. *Cadernos de Agroecologia*, 15(2).
- Liu, J., Wang, X., Zhang, T., y Li, X. (diciembre de 2017). Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological Research*, 205, 107-117.
- Lopez, E., Pistilli, R., y Barrios, E. (Septiembre de 2021). Eficacia de biofertilizantes en la producción de variedades de fréjol. *Idesia*, 39(3), 13-19. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292021000300013>
- Lorenzoni, M., Rezende, R., y Souza, Á. d. (August de 2019). Estimation of the crop coefficient (kc) for bell pepper under greenhouse conditions. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 23(10), 741-746. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v23n10p741-746>
- MAG. (2022). Retrieved 03 de julio de 2022, from Producción de cacao apunta a romper récord este año: <https://www.agricultura.gob.ec/produccion-de-cacao-apunta-a-romper-record-este-ano/#:~:text=En%20Ecuador%2C%20los%20cultivos%20de,Orellana%2C%20Napo%20y%20Zamora%20Chinchipe>.
- Manal, M., y Sayeda, A. (Mayo de 2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology volume*, 19(1).
- Marcela, F. C. (Enero de 2010). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Facultad de Ciencias Biológicas*, 16(2), 239-242.
- Martínez, I. A. (2022). *Caracterización morfofisiológica del efecto de Streptomyces spp. en plantas modelo y de interés agrícola*. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Mauricio, M. (julio de 2014). *Sustratos para pimientos*. Productores de hortalizas.

- Mercasa. (2021). Retrieved 1 de septiembre de 2022, from Statista: <https://es.statista.com/estadisticas/529468/producciones-de-pimientos-frescos-en-el-mundo/#:~:text=Esta%20estad%C3%ADstica%20recoge%2C%20en%20miles,producto%20agr%C3%ADcola%20a%20nivel%20mundial.>
- Muchica, J. (2018). Retrieved 3 de Septiembre de 2022, from Repositorio de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna: http://redi.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/3660/1582_2019_muchica_huamantuma_ja_fcag_agronomia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Oliveira, F., Alves, R., Bezerra, F., y Lima, L. (Marzo de 2018). Heterogeneous salinity in the root system of bell pepper in greenhouse. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(8), 519-524. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n8p519-524>
- Pacheco, S. (2016). *Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados*. Grado de maestro en Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Microbiología, Lima.
- Palacios, A., Rincón, G., Evangelista, Z., Gómez, J., y Quiñones, E. (agosto de 2018). Actinomicetos aislados de rizosfera de nardo (*Polianthes tuberosa*) del estado de Morelos, México. *Agroproductividad*, 11(8). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i8.1098>
- Pedro, R., y Nelson, O. (Junio de 2021). Ecological production of pepper (*Capsicum annum* L.) in the edaphoclimatic conditions of the III Frente. *Ciencia en su PC*, I(2), 82-92.
- Pinales, C. (2015). *Compatibilidad del Enemigo Natural Orius insidiosus en Variedades de Ají 'Morrón' (Capsicum annum L. var. annum) en Cultivos Protegidos*. Universidad Autónoma de Santo Domingo. Retrieved 3 de Septiembre de 2022.
- Posada, A., Mejía, D., Polanco-Echeverry, D., y Cardona, J. (junio de 2021). Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR): Una revisión sistemática 1990-2019. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 161-176.
- Quiñones, E. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, 59-64.
- Reyes, A., Reyes, A., Rincón, G., López, L., y Evangelina, Q. (2017). Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annum* L. AGAINST *Phytophthora capsici*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(3), 513-522. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.4245>

- Rivas, Z. (2022). *Evaluación de dos bioestimulantes sobre el crecimiento inicial de pimiento (Capsicum annum Var. Marconi) en la parroquia Anconcito, de la provincia de Santa Elena*. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Salazar , A., y Ordóñez, C. (2013). *Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Sánchez, B., Ramírez, J., Guevara, L., Raya, J., Covarrubias, J., y Mora, M. (2019). Actinobacterias con potencial antagónico *in vitro* a hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento en plantas de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(23), 339-344.
- Soriano, B., y Soriano , E. (Marzo de 2010). Degradación de pesticidas por Actinomicetos. *USV-Scientia*, 2(1), 34-37.
- Suryanto, D., Bungsu, A., Taniwan, S., Nurwahyuni, I., y Pangastuti, A. (septiembre de 2017). Application of a Single and Combination of Plant-growth Promoting Bacteria and Actinomycete to Increase Chili (*Capsicum annum* L.) Health and Growth. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(3), 1379-1386. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.3.19>
- Torsvik, V., Sorheim, R., y Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities a review. *Industrial Microbiolog*, 17(3), 170-178. <https://doi.org/10.1007/BF01574690>
- Vaca, F. (2021). *Producción y comercialización del pimiento morrón (Capsicum annum var. annum) en la provincia de Imbabura*. Universidad Técnica del Norte. Retrieved 3 de Septiembre de 2022.
- Villegas, M. A., Ayala, Ó., Aguilar, V., y Corona, T. (Enero de 2014). Seed quality evolution of *capsicum annum* L. through different fruit development stages. *Fitotec*, 37(1), 79-87.
- Weintraub, P. (August de 2007). Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production. *Pest Management Science*, 63(8), 753-760.
- Yakhin, O., Lubyantsev, A., Yakhin, I., y Brown, P. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-32.
- Yanez, G., Sanchez, M., Portilla, N. d., y Fuente, J. d. (Diciembre de 2020). Densidad poblacional de actinomicetos en suelos florícolas, enmendados con vermicomposta. *Terra Latinoamericana*, 38(4), 745-753.

Zhigila, D. A., Abdul Rahaman, A. A., Kolawole, O. S., y Oladele, F. (Febrero de 2014).
Fruit Morphology as Taxonomic Features in Five Varieties of *Capsicum annuum* L.
Solanaceae. *Hindawi Publishing Corporation*, 2(6).
<https://doi.org/10.1155/2014/540868>

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo A. Procesamiento de muestras de suelo y aislamiento de actinobacterias.

- a. Zona de recolección de muestras
en cacao



- b. Muestras de suelo



- c. Microorganismos del suelo
procesado



- d. Purificación de actinobacterias



Anexo B. Caracterización morfológica de actinobacterias.

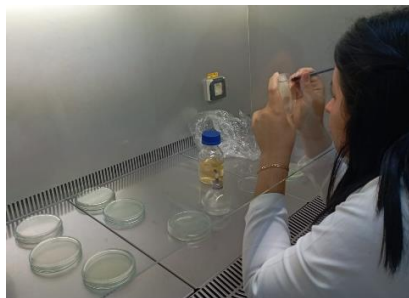
- a. Preservación de cepas de
actinobacterias en glicerina



- b. Incubación de cepas
purificadas

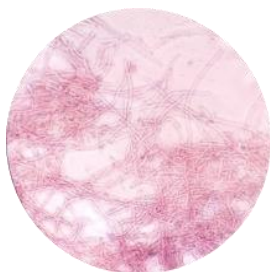


- c. Observación macroscópica de colonias de actinobacterias

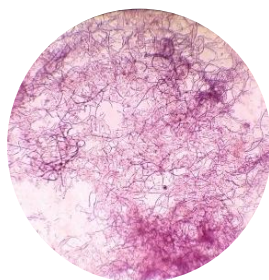


Anexo C. Tinción de Gram de las cepas de actinobacterias, lente 100x.

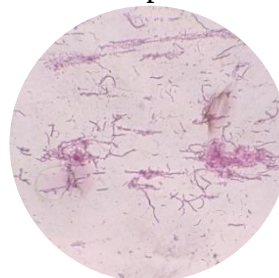
a. Cepa BA



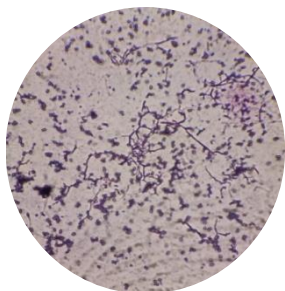
b. Cepa EM



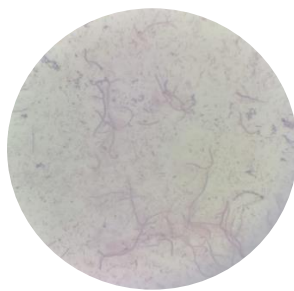
c. Cepa EM2



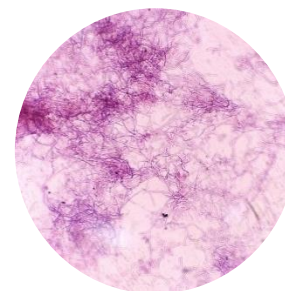
e. Cepa EM3



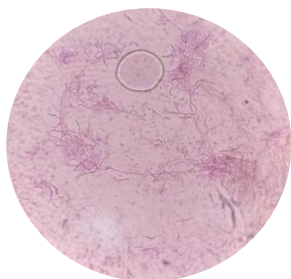
f. Cepa GC1



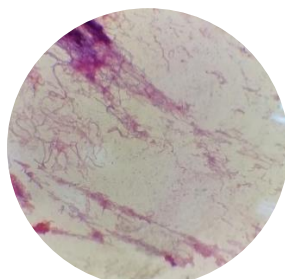
g. Cepa GC2



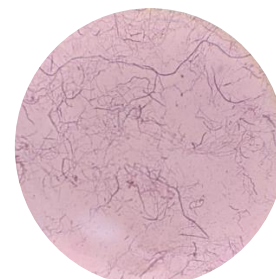
h. Cepa GC3



i. Cepa GC4



j. Cepa GG



Anexo D. Prueba de catalasa.

a. Reacción positiva



b. Reacción negativa

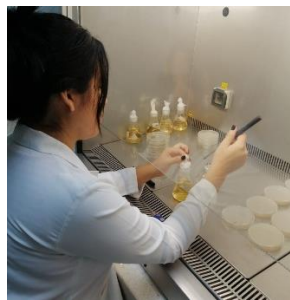


Anexo E. Elaboración de fermentos de actinobacterias.

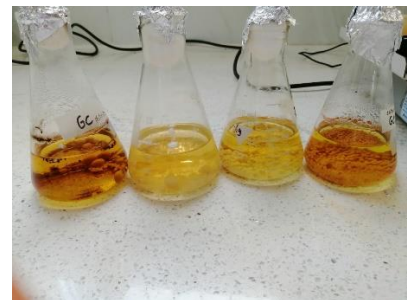
a. Activación de actinobacterias en medio solido



b. Siembra de actinobacterias en medio liquido



c. Crecimiento de actinobacterias en medio liquido

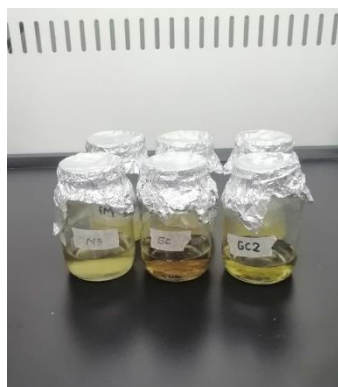


Anexo F. Establecimiento del experimento *in vitro*.

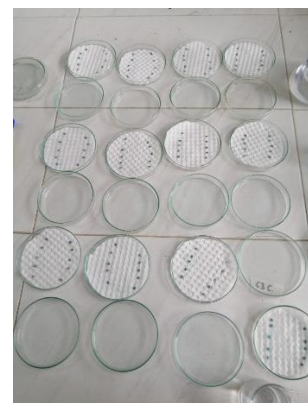
a. Obtención de extractos celulares



b. Inoculación de semillas de pimienta



c. Desarrollo de semillas inoculadas



Anexo G. Establecimiento del experimento *in vivo*.

a. Preparación de sustrato



b. Siembra de semillas inoculadas



c. Aplicación de tratamiento



Anexo H. Evaluación de variables.

a. Altura de planta



b. Diámetro del hipocótilo



c. Longitud de raíz



Anexo I. Análisis de varianza de porcentaje de germinación.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje de germinación	15	0,53	0,35	5,45	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	306,67	4	76,67	2,88	0,08

Código de cepa	306,67	4	76,67	2,88	0,08
----------------	--------	---	-------	------	------

Anexo J. Análisis de varianza del índice de velocidad de emergencia.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
IVE	15	0,76	0,67	16,56	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20,46	4	5,11	8,04	0,0036
Código de cepa	20,46	4	5,11	8,04	0,0036
Error	6,36	10	0,64		
Total	26,81	14			

Anexo K. Análisis de varianza de la altura de la planta.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Altura (cm)	15	0,95	0,93	4,05	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	25,3	4	6,33	45,17	<0,0001
Código de cepa	25,3	4	6,33	45,17	<0,0001
Error	1,4	10	0,14		
Total	26,7	14			

Anexo L. Análisis de varianza número de hojas de la planta.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Número de hojas	15	0,42	0,19	10,43	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,93	4	0,73	1,83	0,1991
Código de cepa	2,93	4	0,73	1,83	0,1991
Error	4	10	0,4		
Total	6,93	14			

Anexo M. Análisis de varianza del diámetro del hipocótilo.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
diámetro hipocotilo	15	0,93	0,91	5,49	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,37	4	0,34	35,87	<0,0001
Código de cepa	1,37	4	0,34	35,87	<0,0001
Error	0,1	10	0,01		
Total	1,46	14			

Anexo N. Análisis de varianza de longitud de radícula de semillas de pimiento *in vitro*.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Longitud de radícula (cm)	15	0,85	0,79	11,74	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,32	4	2,33	14,03	0,0004
Código de cepa	9,32	4	2,33	14,03	0,0004
Error	1,66	10	0,17		
Total	10,98	14			

Anexo O. Análisis de varianza de la longitud radicular.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Longitud radicular	15	0,97	0,96	4,02	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	157,71	4	39,43	76,7	<0,0001
Código de cepa	157,71	4	39,43	76,7	<0,0001
Error	5,14	10	0,51		
Total	162,85	14			

Anexo P. Análisis de varianza del número de raíces secundarias.

Análisis de varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Numero de raíces secundari..	15	0,93	0,9	4,16	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	42,4	4	10,6	31,8	<0,0001

Codigo de cepa	42,4	4	10,6	31,8	<0,0001
Error	3,33	10	0,33		
Total	45,73	14			

Anexo Q. Análisis de varianza del peso del hipocótilo.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Peso hipocotilo (g)	15	1	1	2,38	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,22	4	0,06	838,75	<0,0001
Codigo de cepa	0,22	4	0,06	838,75	<0,0001
Error	6,70E-04	10	6,70E-05		
Total	0,22	14			

Anexo R. Análisis de varianza del peso de la radícula.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Peso Raíz	15	0,86	0,81	12,64	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	4	0,01	15,65	0,0003
Codigo de cepa	0,03	4	0,01	15,65	0,0003
Error	4,70E-03	10	4,70E-04		
Total	0,03	14			