



***Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre plántulas de tomate
(Lycopersicum esculentum) crecidas bajo estrés salino.***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., MARZO 2018**



***Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre plántulas de tomate
(Lycopersicum esculentum) crecidas bajo estrés salino.***

**JEIMMY JOHANNA ALVAREZ RAMIREZ
ANGELA BAQUERO MORALES**

**JAVIER VANEGAS GUERRERO
Asesor Externo**

**CAROLINA JAIME RODRIGUEZ
Asesor Interno**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., MARZO 2018**

DEDICATORIA

Con todo mi cariño le dedico este trabajo principalmente a DIOS por ser mi guía y estar en todo momento difícil. A mi madre y a mi abuelita por brindarme el apoyo en los momentos más difíciles y acompañarme en este camino tan gratificante y a la memoria de mi padre que desde el cielo yo sé que me cuida y acompaña.

Ángela Baquero Morales

A mis padres, pilar fundamental en mi educación, quienes me brindan su apoyo incondicional mantenido a través del tiempo.

A mis hermanas, por ser mis guías y ejemplo, este trabajo va especialmente dedicado a ustedes quienes lo hicieron posible.

A mi sobrina por llenar de alegría mis días

A mi compañera de tesis por acompañarme en los momentos de alegría y frustración, no solo en el desarrollo de este trabajo sino a lo largo de la carrera.

Jeimmy Johanna Álvarez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Queremos dar nuestro profundo y sincero agradecimiento a las personas que han colaborado en la realización del presente trabajo, especial a:

Nuestro asesor externo Javier Vanegas Guerrero Dr. MSc, por la orientación, motivación y apoyo recibido a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Antonio Nariño por acogernos, financiar este proyecto, permitirnos hacer uso de las instalaciones y ayuda necesaria para culminar la investigación.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos los conocimientos en el desarrollo de la carrera y acompañamiento durante esta etapa de nuestras vidas.

Un agradecimiento especial por la comprensión, paciencia y apoyo recibidos de nuestras familias y amigos.

Las actividades de este trabajo están enmarcadas dentro del proyecto: “Mitigación de Estrés Salino en Plantas de Tomate por Levaduras Aisladas de Ambientes Extremos” financiado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por el acuerdo 112 de 2017.

A todos ellos, muchas gracias.

Jeimmy Álvarez Ramírez

Ángela Baquero Morales

Tabla de contenido	
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo general.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. ANTECEDENTES.....	15
3.2 Mitigación del estrés salino.....	16
4. MARCO TEÓRICO	21
4.1 Importancia del cultivo de tomate en Colombia.	21
4.2 Cultivo de tomate.....	21
4.3 <i>Lycopersicum esculentum</i>	22
4.4 Rizósfera	23
4.5 Rizobacterias.	23
4.6 Rizobacterias Promotoras de crecimiento vegetal.....	24
4.7 Mecanismos de acción.....	25
4.7.1 Fijación de nitrógeno	25
4.7.2 Solubilización de Fosfatos	26
4.7.3 Ácido Indolacético.....	27
4.8 ESTRÉS SALINO.....	27
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	29
5.1 PROCEDIMIENTO POR OBJETIVO.....	30
5.1.1 Objetivo 1.	30
5.1.2 Objetivo 2	32
5.1.3 Objetivo 3	34
6. RESULTADOS.....	38
7. DISCUSIÓN.	46
8. CONCLUSIONES	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS.....	62
ANEXO 1: ficha técnica semillas de tomate rio grande.....	62

ANEXO 2: descripción macroscópica y microscópica de rizobacterias gramnegativas TN 106, TN 26, TN 503, TN 333, PA0, AZP.	63
ANEXO 3: protocolo ajuste del inóculo	64
ANEXO 4: solubilización de fósforo.....	65
ANEXO 5: composición del medio NFb, libre de nitrógeno.....	66
ANEXO 6: protocolo de lavado y desinfección de semillas.....	67
ANEXO 7: protocolo ajuste del inóculo	68
ANEXO 9: solución nutritiva hoagland	69
ANEXO 10: peso seco de plántulas inoculada la semilla en tierra.....	70
ANEXO 11: peso seco de plántulas que se inóculo la semilla en turba	71
<i>ANEXO 12: peso seco plántulas inoculadas sobre la tierra</i>	<i>72</i>
ANEXO 13: peso seco de plántulas inoculadas sobre turba y tierra en el momento del transplante	73
ANEXO 14: identificación de las cepas bacterianas seleccionadas (TN503, TN106, TN26 y TN333)	74
ANEXO 15: curvas de calibración mecanismos de acción.....	81
ANEXO 16: crecimiento plántulas de tomate en germinadores	83
ANEXO 17 resultados solubilización de fosfatos en medio SRS	84
ANEXO 18 resultados fijación de nitrógeno en medio SRS.....	85

RESUMEN



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre plántulas de tomate
(*Lycopersicum esculentum*) crecidas bajo estrés salino.**

La salinidad es un factor abiótico de degradación de suelos, limita el desarrollo de las plantas reduciendo la competitividad agrícola. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el crecimiento de plántulas de tomate y la respuesta a la mitigación salina. Se seleccionaron rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) y se determinó la respuesta al estrés salino en plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero. Se caracterizaron mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal la producción de ácido indolacético (AIA), fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos. Treinta y cinco rizobacterias se inocularon a 0,2 Abs en semillas y plántulas de tomate. Las semillas se sembraron por triplicado en semilleros con turba, a los 15 días se trasplantaron las plántulas a suelo. Luego de 31 días se evaluó el peso seco de vástago, raíz y total. Se seleccionaron cuatro

aislamientos TN333, TN106, TN503 y TN26 con aumento en peso seco de vástago, raíz y total superiores a 158, 108 y 139%. Estos aislamientos fueron evaluados bajo tratamientos de 50, 100 y 200mM de NaCl en plántulas de tomates. El tratamiento 50mM de NaCl, TN106 presentó incremento porcentual de peso seco de vástago, raíz y total (19,9;313,8;50,0%). TN503 obtuvo incremento en peso seco total a 100 y 200mM de NaCl (68,9%;37,6%). Todas las rizobacterias solubilizaron fosfatos (32,03-63,91mg/ml PO_4), produjeron NH_4^+ (12,45-21,74ppm de amonio), y AIA (0,50-13,74 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados demostraron que la inoculación de PGPR representa una alternativa biotecnológica para promover el crecimiento de *Lycopersicum esculentum*

PALABRAS CLAVES: PGPR, rizobacterias, estrés salino, mecanismos de acción.

1. INTRODUCCIÓN.

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo con gran valor económico, es cultivado en zonas con gran variabilidad climática y de suelo, aunque se cultiva en climas secos, tanto para producción en estado fresco como para uso agroindustrial. El fruto del tomate es fuente de vitaminas, minerales, proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico (1). El aporte de cada 100 g de nutrientes del tomate en agua es del 93,5% y aporta 23 kcal de energía para las actividades diarias (1,2).

En el año 2012 se produjeron 161.793.834 toneladas (T) de tomate a nivel mundial, China es el principal productor con 50.000.000 T (2). Para el año 2013 en Colombia se produjo 412.351 T, Norte de Santander fue el principal departamento productor con 119.787 T. En el año 2015 Colombia contaba con 2.869.913 hectáreas sembradas, un área inferior al potencial de tierra arable del país, las cuales 8.992 corresponden a áreas sembradas y 7.274 a áreas cosechadas de tomate (3).

En el año 2013 se exportó tomate desde Colombia por un valor de 298.565 USD, dirigidos hacia Antillas Holandesas (228.174 USD), Arúba (49.200 USD), Ecuador (18.910 USD) y España (2.281 USD). Cundinamarca, Atlántico, Bogotá, Santander y Risaralda fueron los mayores exportadores con una participación del 52,8%, 37,9%, 6,3%, 2,3% y 0,8% respectivamente (1). El crecimiento del sector agrícola nacional, además de expandir las hectáreas cultivadas, debe incrementar la competitividad del sector dentro de los mercados nacionales e internacionales. El costo de producción determina dicha competitividad e incrementa la adquisición de insumos, fertilizantes y pesticidas (4).

El cultivo de tomate en Colombia utiliza agroquímicos a altos costos, como fertilizantes y pesticidas, productos que los tomateros usan de manera excesiva, aumentan los costos de producción, causan problemáticas ambientales y de salud a los consumidores. El empleo excesivo de agroquímicos rompe el equilibrio

biológico y destruye los insectos benéficos. Muchas de las especies de plagas de importancia secundaria se tornan primarias ante la presión de plaguicidas (5).

Las condiciones climáticas, de sequía o lluvia, afectan la productividad de los cultivos por cambios extremos de temperatura y humedad relativa, al favorecer el ataque de plagas y enfermedades, ante lo cual el productor utiliza mayores concentraciones de plaguicidas y fertilizantes, por tanto, el costo de producción se incrementa, disminuyendo la rentabilidad (5).

El conocimiento de factores bióticos y abióticos que influyen en el desarrollo de las plantas es de vital importancia para optimizarlo. La salinidad en el suelo es un factor abiótico que afecta la producción de tomate en todo el mundo. En la región del Alto Ricaurte en Boyacá, Colombia, la producción de tomate se afectó por la acumulación de sales aplicadas en fertilizantes con consecuencias negativas a largo plazo (6).

El estrés salino reduce el desarrollo de las plantas, ya que pueden sufrir diversos tipos de estrés, como el estrés hídrico, toxicidad específica, desbalance nutricional, debido a los altos niveles de sodio y cloruro que reducen la captación de K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , etc., e incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno que dañan las macromoléculas (7). Las rizobacterias pueden promover el crecimiento vegetal y mitigación al estrés salino en diversos cultivos como lechuga, tomate y trigo (8–10).

La salinización de los suelos es el proceso de acumulación en el suelo de sales solubles en agua. Esto puede darse en forma natural, cuando se trata de suelos bajos y planos, que son periódicamente inundados por ríos y arroyos; o si el nivel de las aguas subterránea es poco profundo y el agua que asciende por capilaridad contiene sales disueltas. Cuando este proceso tiene un origen antropogénico, generalmente está asociado a sistemas de riego. Se llama suelo salino a un suelo con exceso de sales solubles. Estas concentraciones de sales afectan el crecimiento de las plantas al restringir la absorción de agua y la absorción

equilibrada de iones nutricionales esenciales por las raíces. La salinidad es uno de los factores más graves que limita la productividad de los cultivos agrícolas, con efectos adversos sobre la germinación, el vigor de la planta y el rendimiento del cultivo. La salinización del suelo está reduciendo el área que se puede usar para la agricultura aproximadamente en un 1-2% cada año. Los cultivos como cereales (arroz y maíz), forrajes (trébol) o cultivos hortícolas (patatas y tomates) son relativamente susceptibles a la concentración excesiva de sales, ya sea disuelto en agua de riego o presente en la solución del suelo (rizósfera). Se ha informado que la salinidad del suelo reduce los rendimientos, la nodulación y el contenido total de nitrógeno en las plantas leguminosas encontrando que el peso seco de diferentes órganos vegetales del tomate se redujo en respuesta al aumento del nivel de NaCl en el medio de crecimiento de la raíz (11).

El IDEAM indica que el 45% de los suelos del país presentan algún grado de susceptibilidad a la degradación por salinización, en la cual se debe realizar monitoreo y seguimiento para identificar, analizar y evaluar los procesos actuales de degradación por salinización, con miras a prevenir, mitigar, rehabilitar o controlar la degradación de los suelos por salinización (12).

Los departamentos de La Guajira, Atlántico, Magdalena, Sucre y Córdoba presentan más de un 30% de susceptibilidad alta a muy alta, siendo la Guajira el departamento más susceptible a degradación por salinización con un 72% del área en estas dos clases. El departamento del Cesar presenta un 27% de la superficie en clase muy alta. Los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Huila, Magdalena y Sucre presentan más de un 20% de la superficie con susceptibilidad media a salinización, siendo Sucre el departamento con mayor área (más de 50%) (12).

Los suelos con susceptibilidad alta corresponden a aquellos donde las condiciones tanto naturales como antrópicas son propicias para que los procesos de salinización

ocurran de una forma acelerada, especialmente si las actividades antrópicas son de alto impacto o modifican drásticamente la condición natural de los suelos (12).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y la respuesta a la mitigación del estrés salino.

2.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar rizobacterias con actividad promotora de crecimiento en plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) bajo condiciones de invernadero.
2. Evaluar la respuesta al estrés salino en plántulas de tomate al inocularse con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.
3. Caracterizar los mecanismos de acción de las rizobacterias con actividad promotora de crecimiento en plántulas de tomate.

3. ANTECEDENTES.

3.1 Promoción de crecimiento vegetal por rizobacterias.

Ghyselincka et al., (2013) aislaron 585 rizobacterias de papa y encontraron que 58 aislamientos presentaban antagonismo *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*. Ellos evaluaron la capacidad de los aislamientos asociados con la promoción del crecimiento de la planta y la supresión de la enfermedad contra *Phytophthora infestans* y *R. solani* en plántulas de papa, mediante la solubilización de fosfatos, producción AIA, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa, sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y amonio (NH₃). De los 58 aislamientos, 23 mostraron una respuesta favorable bajo presión de la enfermedad y/o mostraron un aumento en el peso de la planta en comparación con el testigo no inoculado. Las plantas crecieron más con los aislamientos productores de NH₃ frente a los no productores. No se encontró relación lineal con el aumento de la biomasa vegetal en la inoculación de aislamientos solubilizadores de fosfato, productores de ácido indolacético y ACC desaminasa (13).

Anwar et al., (2016) aislaron 98 actinomicetos rizosféricos de trigo y tomate en Punjab y Pakistán. Alrededor del 30% de los aislamientos promovieron el crecimiento vegetal y se identificaron como *Streptomyces*. Las cepas *Streptomyces nobilis* WA-3, *Streptomyces kunmingensis* WC-3 y *Streptomyces enissocaesilis* TA-3 produjeron 79,5, 79,23, y 69,26 mg/ml de ácido indolacético respectivamente. *Streptomyces* sp. WA-3 produjo la mayor concentración de fosfato soluble (72,13 mg/100ml), seguido de *S. djakartensis* TB-4 (70,36 mg/100ml). Todos los aislamientos produjeron sideróforos, NH₃ y HCN. *S. mutabilis* WD-3 mostró mayor actividad ACC-desaminasa (1,9 mmol/l). Se observaron aumentos significativos en la longitud de los brotes, raíz, peso fresco, peso seco y aumento en el número de follaje en plantas de trigo inoculadas con *S. nobilis* WA-3 en comparación con las plantas control. En general, estos *Streptomyces* son candidatos para desarrollarse

como biofertilizantes al estimular el crecimiento y rendimiento en el cultivo de trigo (14).

Islam et al., (2016) evaluó el crecimiento de plantas de pepino por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y la capacidad para suprimir a *Phytophthora*. Se caracterizaron 66 rizobacterias midiendo la fijación de nitrógeno, la producción de ácido indolacético y antagonismo. Se seleccionaron 10 cepas identificadas como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas*. Las plantas de pepino inoculadas mostraron niveles más altos de germinación, vigor de las plántulas, crecimiento y el contenido de nitrógeno en la raíz en comparación con las plantas no tratadas. El tratamiento con las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal suprimió significativamente la fitopatología por *Phytophthora capsici* (15).

3.2 Mitigación del estrés salino.

Karlıdag et al., (2013) Aislaron 44 rizobacterias de plantas en suelos salinos y seleccionaron cinco rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (*Bacillus subtilis* EY2, *Bacillus atrophaeus* EY6, *Bacillus sphaericus* EY30 B, *Staphylococcus kloosii* EY37 y *Kocuria erythromyxa* EY43). La inoculación con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la planta de fresa aumentó significativamente el crecimiento, contenido de clorofila, nutrientes y rendimiento de las plantas. Las cepas EY43 (48%) y EY37 (46%) presentaron los mayores crecimientos en plantas bajo estrés salino. La cepa EY43 también presentó el mayor nivel de nitrógeno (N), potasio (K), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), manganeso (Mn), cobre (Cu) y hierro (Fe). La inoculación con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal podrían atenuar los efectos del estrés salino en el crecimiento de las plantas de fresa (16).

Sánchez, et al., (2014) evaluaron la respuesta de *Acacia decurrens* a la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal halotolerantes asociadas a esta

leguminosa. Se aislaron 44 aislamientos de la rizósfera de *Acacia decurrens* que fueron caracterizadas para la producción de NH_3 , producción de exopolisacáridos, producción de indoles y solubilización de fosfatos. Los aislamientos ACSA12, ACSA14 y ACSA19 aumentaron de manera significativa la biomasa y el desarrollo de la planta en condiciones de invernadero (17).

Habib et al., (2016) caracterizaron rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal con actividad ACC desaminasa y el efecto sobre la tolerancia al estrés por salinidad en la planta de *Abelmoschus esculentus*. Las plantas inoculadas con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal mostraron mayor porcentaje de germinación, todas las semillas germinaron a 75 mM de NaCl y presentaron un aumento en los parámetros de crecimiento y contenido de clorofila *a* en comparación a las plantas no inoculadas. Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal inoculadas en plantas bajo estrés salino aumentaron la actividad de las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) y la regulación positiva de genes de la ruta ROS (CAT, APX, GR, y Dhar). La inoculación con *Enterobacter* sp. UPMR18 incrementó significativamente todos los parámetros analizados bajo estrés salino, en comparación con los demás tratamientos (18).

Bharti et al., (2016) evaluaron la cepa *Dietzia natronolimnaea* STR1 en promoción de crecimiento en plantas de trigo y la mitigación al estrés salino mediante expresión de genes responsables de la tolerancia a la salinidad en plantas. Se incrementó la expresión de genes relacionados con el estrés salino de enzimas antioxidantes como APXCAT, superóxido dismutasa manganeso (MnSOD), peroxidasa (POD), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR). Un mayor contenido de prolina en plantas de trigo inoculadas con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal contribuyó a una mayor tolerancia al estrés por salinidad. No detectaron solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, ni actividad ACC desaminasa en *D. natronolimnaea* STR1. Las plantas siguen diversos tipos de mecanismos tolerantes a la sal como la síntesis de osmolitos, poliaminas, reducción del nivel de especies

reactivas del oxígeno y/o la producción de iones de transporte. Documentaron un aumento significativo en el crecimiento de trigo inoculado con *D. natronolimnaea* STR1 en comparación con la planta de trigo sin inocular (control), tanto en condiciones salinas como no salinas, así como una mayor biomasa, elongación en las raíces y aumento de los pigmentos fotosintéticos. *D. natronolimnaea* STR1 promueve el crecimiento de plantas con y sin estrés salino (19).

3.3. Mitigación del estrés salino en plantas de tomate.

Mayak et al (2004) evaluó la resistencia del tomate al estrés salino tras el tratamiento con siete rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal con actividad ACC desaminasa en presencia de 43 mM NaCl durante 7 semanas, el aislamiento con mayor promoción de crecimiento fue identificado como *Achromobacter piechaudii*. Esta bacteria aumentó significativamente el peso fresco y seco de las plántulas de tomate cultivadas en presencia de una sal de NaCl de hasta 172 mM. La bacteria redujo la producción de etileno por las plántulas de tomate, pero no redujeron el contenido de sodio. Sin embargo, aumentó ligeramente la absorción de fósforo y potasio, lo que puede contribuir en parte a la activación de los procesos implicados en el alivio del efecto de la sal. En presencia de sal, la bacteria aumentó la eficiencia del uso del agua. Esto puede sugerir que la bacteria actúe para aliviar la supresión de sal de la fotosíntesis. Sin embargo, el mecanismo detallado no fue dilucidado(20).

J. M. Dell'Amico y Margarita Parra (2005) evaluaron el efecto del estrés salino por NaCl (100 mM), potencial osmótico y crecimiento en dos cultivos de tomate (cultivar INCA y cultivar Amelia, las plantas de tomate fueron cultivadas en condiciones de hidroponía y en cámara de crecimiento en ambiente controlado. Se evaluaron a los 8, 15 y 22 días de tratamiento salino de NaCl (100 mM). Mostraron que las plantas del cultivar INCA presentaron concentraciones mayores de Cl en la raíz y menores en las hojas con respecto al cultivar Amalia. Las variaciones en el potencial osmótico fueron tan definidas y estables como en el caso del contenido de ion Cl. La tasa de crecimiento indico adaptación al estrés salino en las plantas del cultivar INCA, pero

resultan más sensibles a la salinidad en los primeros días de estrés por NaCl y el cultivar Amalia presentó una mayor sensibilidad al componente hiperiónico (21).

Morales et al, (2010) determinó el comportamiento de plantas de tomate en distintos tratamientos salinos, evaluó el crecimiento de las plantas sometidas a tratamientos con NaCl durante 264 h en una cámara de crecimiento con fotoperiodo cada 13 h, temperatura y humedad relativa. Las plantas fueron evaluadas en macetas con arena sílice sobre, se les adicionó solución nutritiva de Hoagland. Realizó cuatro tratamientos que fueron 0, 50, 100 y 200 mM de NaCl luego de concluir la aplicación del NaCl las plantas se dejaron en condiciones de solución nutritiva durante 264 h para evaluar la recuperación. Se evaluaron a las 24, 48, 120 y 264 h de aplicados los tratamientos la biomasa, conductancia estomática, transpiración, los potenciales hídricos foliar, osmótico, de presión y la conductividad hidráulica. Se reflejó una disminución significativa en las variables evaluadas, al incrementarse el contenido de NaCl en el medio y se precisó que a las 24 h de aplicados los tratamientos, no se produjo ajuste osmótico (22).

Shimalia et al (2014) estudio, la capacidad de ACC deaminasa que contiene las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal *Pseudomonas fluorescens* (YsS6), *Pseudomonas migulae* (8R6), y sus mutantes deficientes en ACC deaminasa para promover el crecimiento de la planta de tomate en ausencia de sal y bajo dos niveles diferentes de estrés salino (165 mM y 185 mM)) evidenciaron que los aislamientos bacterianos de tipo salvaje (*P. fluorescens* YsS6 y *P. migulae* 8R6) promovieron significativamente el crecimiento de la planta de tomate incluso en ausencia de salinidad. Concluyen que la ACC desaminasa es directamente responsable del comportamiento de las plantas de tomate en respuesta al estrés salino, por tanto en uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal con actividad ACC deaminasa tiene el potencial de facilitar el crecimiento de las plantas en terrenos que normalmente no son adecuados para la mayoría de los cultivos debido a su alto contenido de sal (23).

Las rizobacterias tienen la capacidad de promover el crecimiento de tomate bajo condiciones de salinidad. Mayak et al encontró que *Achromobacter piechaudii* aumentó significativamente el peso fresco (49,6%) y seco (60,8%) de plántulas de tomate cultivadas en presencia de 172 mM de NaCl. Shimaila et al, encontró que la inoculación de *P. fluorescen* aumentó significativamente el peso fresco (300 Y 464,5%) y seco (151,4 y 156%), así como la inoculación de *P. migulae* presentó un incremento en peso fresco (384,8 y 616,9%) y seco (245,7 Y 336%) de plántulas de tomate cultivadas en 165 y 185 Mm. El mecanismo de acción descrito por los autores fue la capacidad de la cepa en producir la enzima ACC desaminasa (20,23).

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Importancia del cultivo de tomate en Colombia.

La horticultura puede generar ingresos importantes, si se proyecta adecuadamente la comercialización en el mercado nacional e internacional. La hortaliza que más se cultiva en el mundo es el tomate, con gran importancia económica, por tanto, la demanda aumenta continuamente junto al cultivo, producción y comercialización. El tomate puede cultivarse durante todo el año, pero las heladas y el calor excesivo pueden dificultar el buen desarrollo (5). Además, comprende un valor nutricional importante porque es fuente de vitaminas, minerales, proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico (24).

En el año 2012 se produjeron 161.793.834 T de tomate a nivel mundial. China es el principal productor con 50.000.000 T, seguido por India con 17.500.000 T, Estados Unidos con 13.206.950 T, Turquía con 11.350.000 T y Egipto con 8.625.219 T. En el año 2013 Colombia produjo 412.351,2 T. Las zonas de mayor producción son Norte de Santander, Antioquia, Boyacá, Santander y Cundinamarca. En el año 2015 Colombia contaba con 2.869.913 ha sembradas. Si bien se cultiva tomate en más de cien países tanto para consumo fresco como para industria, los diez principales productores concentran más del 70% del total mundial. Colombia ocupa el puesto No. 32 en la producción mundial de tomate (24).

4.2 Cultivo de tomate.

El tomate (*Lycopersicum esculentum*) se originó en Sudamérica extendiéndose a nivel mundial (2). El tomate se cosecha luego de 45-55 días de la floración, presenta colores que varía de amarillo a rojo, al igual que sus tamaños dependen del tipo de variedad y las condiciones a las que se someten (2).

Las plantas de tomate tienen una raíz de aproximadamente de 50 cm de profundidad, produce raíces densas tanto laterales como adventicias. El tallo crece a una longitud de 2-4 metros es sólido, grueso, afelpado y glandular acompañado de hojas de 15-50 cm de largo y 10-30 cm de ancho. La flor del tomate mide de 1,5-2 cm de diámetro y crecen frente o entre las hojas. El fruto del tomate es una Baya carnosa, de forma globular, de 2-15 cm de diámetro. El fruto inmaduro es verde y los maduros pueden variar de amarillo, naranja a rojo. Las semillas son numerosas, en forma de riñón o pera, son gamuzadas, de color marrón claro de 3-5 mm de largo con 2-4 mm de ancho, tienen un peso aproximado de 2,5 - 3,5 g por 1.000 semillas (2). El tomate se adapta a distintos climas, pero el tejido se afecta a temperatura inferiores de 10°C o superiores a 38°C. El crecimiento óptimo del tomate es de 21-24°C (2).

La siembra del tomate se elabora preferiblemente en condiciones de invernadero, semilleros o en bandejas de plántulas, lo que permite un mejor control, selección y cuidado de las mismas. El cultivo de tomate no es exigente en el tipo de suelo, pero prefiere los suelos con altos niveles de retención de agua y buen porcentaje de nutrientes, se desempeña bien en pH ácidos de 5,5 (25).

4.3 *Lycopersicum esculentum*

Es una planta herbácea que puede desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta. El sistema radicular consta de raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. El tallo principal posee un grosor que oscila entre 2-4 cm en la base, en el que se desarrollan hojas, tallos secundarios, inflorescencias y frutos. La hoja es compuesta e imparipinnada, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternativa sobre el tallo. La flor es regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color

amarillo y dispuestos de forma helicoidal a intervalos de 135° e igual número de estambres soldados que se alternan con los pétalos y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo, y de un ovario bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso (dicasio), generalmente en número de 3 a 8 en variedades comerciales de tomate calibre mediano y grande. El fruto puede alcanzar entre unos pocos miligramos y 600 gramos. Está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (26).

4.4 Rizósfera

Se le denomina rizósfera a la zona del suelo que rodea y es influenciada por la raíz de la planta. Esta área sostiene intensa actividad biológica y química por los compuestos exudados propios de la raíz y microorganismos que se alimentan de estos (27). A medida que crecen las raíces liberan compuestos solubles en el agua como aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos que son metabolizados por los microorganismos o disponibles para la planta. Todas esas características hacen de la rizósfera un medio ambiente más dinámico del suelo (27).

4.5 Rizobacterias.

Las plantas constituyen excelentes hábitats microbianos. Las raíces se desarrollan en un medio cuya humedad es poco variable con concentraciones de nutrientes altas, constituyendo un ambiente ideal para la acción microbiana (28). Las bacterias que colonizan la raíz y el suelo rizosférico son denominadas “rizobacterias” (29). Estas bacterias pueden desarrollarse en diferentes partes de la planta, una de las zonas con principal actividad microbiana en los cultivos es la rizósfera, creándose interacciones beneficiosas entre vegetales y microorganismos influyendo sobre la biología y la química del suelo; entre estas interacciones encontramos la excreta de exudados por la raíz de las plantas formados por azúcares, mucigel, ácidos

orgánicos y aminoácidos, lo cual crea un medio selectivo para la existencia de grandes poblaciones microbianas, que aprovechan estos exudados y retribuyen a la planta ampliando la capacidad de absorber nutrientes (28,30).

Las rizobacterias se caracterizan por ser versátiles en la transformación, movilización, y solubilización de diversos nutrientes. La presencia de rizobacterias implica una mayor disponibilidad de elementos químicos en comparación con los suelos que no presentan una alta actividad microbiana (31), por tanto, las rizobacterias son cruciales para la fertilidad del suelo (30) ya que presentan una asociación dinámica con los ciclos biogeoquímicos de los elementos como el C, P, N y S, además, de la producción de fitohormonas y antibióticos (26).

Las rizobacterias establecen interacciones positivas, negativas y neutras con la vegetación y se pueden clasificar como, rizobacterias extracelulares relacionadas con el estímulo indirecto del crecimiento de las plantas o rizobacterias intracelulares que estimulan el crecimiento de las mismas en función de una estrecha interacción con las plantas (32).

Los usos de métodos biológicos para mejorar la producción de cultivos están ganando una amplia acogida entre los agricultores con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos (33), debido al impacto negativo sobre el medio ambiente y al alto precio en el mercado internacional que mantienen los fertilizantes y pesticidas químicos. Las bacterias de la rizósfera pueden emplearse como un reemplazo de agentes químicos y tóxicos para el ambiente, genera una solución a los problemas ambientales causados por la agricultura intensiva tradicional (28).

4.6 Rizobacterias Promotoras de crecimiento vegetal.

Kloepper (1978) demostró que las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal aumentan el crecimiento vegetal, incrementa la defensa frente a microorganismos que causan patologías en las plantas (34), mejoran la asociación simbiótica (30), aumentan la biomasa y colonizan raíces (35).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal producen una síntesis de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Tien *et al.*, (1979) (36) determinaron que el incremento de fitohormonas favorece el crecimiento de la raíz y la parte aérea de la planta. Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal mantienen efectos similares a los tratamientos con fitohormonas (35) como la producción de auxinas y giberelinas, convirtiéndose en una alternativa amigable para los cultivos sin ocasionar daños ambientales .

4.7 Mecanismos de acción

4.7.1 Fijación de nitrógeno

La atmósfera está rodeada por casi un 80% de N, pero es un factor que limita el crecimiento vegetal ya que no está disponible en forma gaseosa y solo algunos organismos procariotas tiene la posibilidad de reducirlo a NH_3 por medio de la fijación biológica de nitrógeno (37).

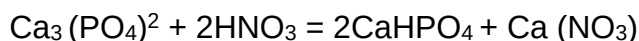
Los microorganismos fijadores de nitrógeno o diazótrofos llevan a cabo este proceso por medio del complejo enzimático de la nitrogenasa, capacidad que llevan a cabo en vida libre o en simbiosis (38). Los microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno se dividen en dos grupos. El primer grupo pertenece a bacterias móviles del suelo, las cuales son atraídas por la raíz gracias a los compuestos que se liberan allí. El segundo grupo se conforma por Actinomicetos (bacterias Gram-positivas) que modulan raíces de muchos árboles y arbustos (39).

4.7.2 Solubilización de Fosfatos

El P es un nutriente de gran importancia que interviene en el crecimiento vegetal; puede encontrarse en grandes cantidades en el suelo, en forma orgánica e inorgánica (40,41). La mayoría del P disponible en el suelo es insoluble (42), la disponibilidad de este elemento para las plantas es baja en sus formas solubles; monobásica $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ y dibásica HPO_4^{-2} , ya que se mantienen en bajas concentraciones (43).

Algunas bacterias rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal presentan la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de compuestos inorgánicos u orgánicos, mediante el uso enzimas como: las fosfatasas no específicas, fitasas, fosfatasas y C-P lipasas (44). Otro mecanismo usado por los microorganismos para la obtención de este nutriente es la liberación de ácidos orgánicos, con capacidad de quelar el fósforo disponible en el suelo utilizando los radicales hidroxilo y carboxilo (45,46).

Las enzimas C-P lipasas solubilizan fósforo a partir de componentes orgánicos del suelo, actúan sobre el enlace carbono-fósforo de los compuestos organofosforados. La liberación de las formas solubles a partir del fósforo mineral, se realiza con la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico o 2-cetoglucónico, la bioproducción depende de la fuente de carbono disponible en la rizósfera (47). Generalmente los ácidos más empleados en la solubilización del fósforo son ácido nítrico y el sulfúrico. Diversas rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal son capaces de solubilizar fósforo tricíclico por la producción de ácidos mediante la siguiente reacción:



Fosfato tricíclico + Ácido nítrico = Fosfato de calcio + nitrato de calcio (48).

El P constituye la base para los ácidos nucleicos, el transporte de azúcares a través de la membrana e innumerables usos para los organismos vivos. En el suelo encontramos el fosfato como iones orto-fosfato, procedente de la mineralización de

materiales orgánicos. La ausencia de este elemento en el suelo constituye un mayor problema para las plantas en relación con el crecimiento (48).

Entre las bacterias rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal con capacidad de solubilizar fosfatos se encuentran los géneros *Achromobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Azospirillum lipoferum.*, *Burkholderia sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Microbacterium sp.*, *Serratia*, *Beijerinckia sp.*, así como las especies: *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus circulans*, *Cladosporium harbarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Rhizobium leguminosarum* (49).

4.7.3 Ácido Indolacético.

El ácido indolacético es una de las auxinas de mayor actividad, estimula el crecimiento del tallo principal y reduce el crecimiento de ramales laterales (50).

La mayoría de moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, pero también se encuentran otros compuestos con actividad auxínica. Las auxinas generan mayor elongación del tallo y coleópteros, formación de las raíces, floración y diferenciación vascular (51).

4.8 ESTRÉS SALINO.

La salinidad es un estrés abiótico complejo, que a la vez presenta componentes osmóticos e iónicos. Concentraciones elevadas de sales en el medio radical son poco favorables para el desarrollo de la planta, debido a los efectos hiperosmóticos e hiperiónicos que generan estrés a la planta (52). Defectos en la autorregulación, tanto hídrica como iónica, provoca graves daños moleculares, que detienen el crecimiento de la planta, ya que, se restringe la absorción de agua por las raíces por disminución del potencial hídrico del medio, además, de la absorción de iones salinos, acumulándose en los tejidos de la planta en concentraciones que llegan a

ser tóxicas e inducen a desequilibrios nutricionales por modificación de la absorción y distribución de nutrientes esenciales (52).

Dada a condiciones de salinidad en el medio `pueden afectarse tres procesos de germinación de la plántula, como lo son la imbibición del agua, activación y/o síntesis de enzimas relacionadas con el transporte de nutrientes, sustancias al eje embrionario y crecimiento activo (22).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

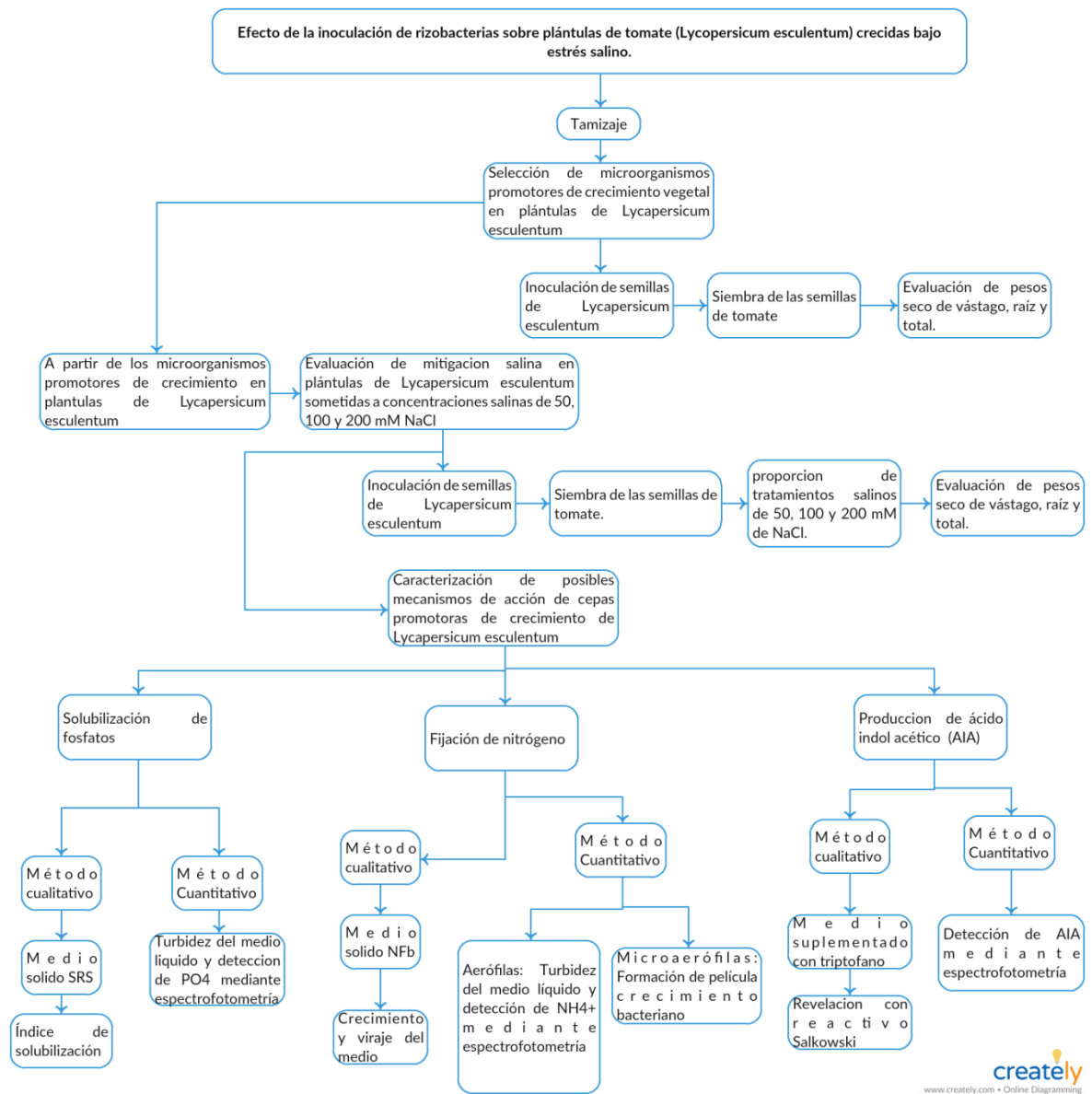


Fig. 1 Diagrama general del diseño metodológico

5.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

1. **TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Trabajo de tipo experimental
2. **LUGAR:** Este proyecto se desarrolló en los laboratorios de investigación en la Universidad Antonio Nariño.
3. **UNIVERSO:** Rizobacterias asociadas a plantas.
4. **POBLACIÓN:** Rizobacterias en plántulas de tomate y lechuga.
5. **MUESTRA:** 11 rizobacterias aisladas de cultivo de lechuga, 22 aisladas de cultivo de papa y dos controles *Pseudomonas aeruginosa* (PA0) y *Azospirillum lipoferum*. (AZP) Un total de 35 cepas proporcionadas por el cepario de la Universidad Antonio Nariño.

5.2 HIPÓTESIS: Existen rizobacterias que promueven el crecimiento en tomate y mitigan el estrés salino mediante mecanismos como la producción de AIA, la solubilización de fósforo y la fijación de nitrógeno.

5.3 PROCEDIMIENTO POR OBJETIVO.

5.3.1 Objetivo 1.

Seleccionar rizobacterias con actividad promotora de crecimiento en plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) bajo condiciones de invernadero.

- **Variable independiente:** Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.
- **Variable dependiente:** Peso seco vástago, peso seco raíz y peso seco total.
- **Indicador:** incremento porcentual del peso seco respecto al control negativo.

Técnicas A partir de las 35 cepas, 11 de la rizósfera en lechuga, 22 de papa y dos controles PA0 y AZP. Se realizaron bioensayos en condiciones de invernadero de promoción de crecimiento en plántulas de tomate variedad Río Grande y se evaluaron parámetros de crecimiento como peso seco de la raíz, vástago y total.

Nota: La metodología de este objetivo se empleó en el objetivo dos de mitigación de estrés salino.

- **Aislamiento y pureza.**

Las cepas se conservaron -20°C en caldo nutritivo con glicerol al 50%. Los aislamientos fueron reactivados en agar nutritivo. Se incubaron por 24 h a 37°C. Posterior al tiempo de incubación, se observó crecimiento uniforme de las unidades formadoras de colonia (UFC) en el medio de cultivo, se realizó tinción de Gram de cada una de las cepas para verificar la pureza de las mismas.

- **Pre inóculo.**

Se evaluó la pureza de la cepa e inoculó una UFC de los aislamientos en 5 ml de caldo nutritivo en tubos Falcon, se dejó en incubación por 18 h a 37 °C a 200 rpm.

- **Ajuste del inóculo.**

Pasadas las 18 h se verificó turbiedad en caldo nutritivo. El tubo Falcón se centrifugó a 7.500 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se re suspendió el pellet en 5 ml de Agua Destilada Estéril (ADE).

En un espectrofotómetro se realizó el ajuste del inóculo a 600 nm usando como blanco ADE. El inóculo se ajustó a 0,2 absorbancias. En condiciones estériles se tomó 1 ml del pre inóculo para el primer ajuste frente al espectrofotómetro, se colocaron los ml de ADE necesarios para ajustar a 0,2 absorbancias. En condiciones estériles se tomó 1 ml del pre-inóculo de la cepa, se agregó igual volumen de ADE utilizada en el primer tubo Falcon en condiciones no estériles frente el espectrofotómetro, de esta forma el inóculo queda a 0,2 absorbancias a 600 nm en todas las muestras.

- **Lavado de Semillas.**

Se utilizaron semillas variedad Río Grande, para retirar el fungicida y garantizar la ausencia de otros microorganismos se realizaron tres lavados con ADE, se lavó con alcohol al 30% durante un 1 min y finalmente tres lavados con ADE.

- **Siembra.**

En turba estéril se sembraron cuatro semillas en cada espacio de un semillero de 128 pozos, se regaron con abundante agua.

- **Riego.**

Diariamente se agregaron 2 ml de agua (capacidad de materia) para evitar escorrentía, pero suficiente agua para mantener la humedad del sustrato y evitar el estrés hídrico en la planta.

- **Raleo, trasplante e inoculación.**

Se dejó una sola plántula con hojas verdaderas. Esta se trasplantó a suelo no estéril y se agregó 1 ml del inóculo en turba y otro 1 ml en suelo.

- **Recolección de muestras.**

El muestreo se realizó cuando las plántulas presentaron más de dos hojas verdaderas. Se retiró el suelo de la raíz con agua de grifo. Las plántulas se dividieron la parte aérea y radicular. Se colocaron en bolsas de papel Kraft y se secaron a 50°C por 3 días. Se midió el peso seco de la parte aérea, raíz y peso seco total.

- **Análisis estadístico.**

Se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias entre las medias de peso seco de vástago, raíz y total, luego de comprobar los supuestos de ANOVA. Este análisis se desarrolló con el programa estadístico MiniTab.

5.3.2 Objetivo 2

Determinar la respuesta al estrés salino de plántulas de tomate al inocularse con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

- **Variable independiente:** Mejores rizobacterias seleccionados.

- **Variable dependiente:** Peso seco de vástago, peso seco de raíz y peso seco total.

- **Indicador:** Porcentaje de incremento respecto al control.

Técnicas:

A partir de las cepas seleccionadas en el objetivo 1, se realizó un bioensayo bajo condiciones de invernadero, en plántulas de tomate sometidas a estrés salino. Se tomó como parámetros de crecimiento: peso seco de vástago, raíz y total; se evaluaron los datos obtenidos respecto al control negativo. Se llevaron cuatro procesos que permitieron evaluar el efecto de rizobacterias:

1. **Siembra de semillas de tomate.** Siembra semillas en el sustrato para el crecimiento de plántulas
2. **Inoculación de las plántulas.** Adición de los aislamientos a semillas de tomate.
3. **Tratamiento salino:** Se proporcionó a las plántulas de tomate tratamientos salinos de 50, 100 y 200 mM de NaCl.
4. **Muestreo.** Se retiró el suelo la raíz de la plántula, se tomaron los datos para el análisis estadístico.

Se realizó la metodología propuesta en el objetivo número uno desde el ajuste del inóculo hasta el raleo trasplante e inoculación.

- **Tratamientos salinos.**

Las plántulas con más de dos hojas verdaderas se sometieron a 50, 100 y 200 mM de NaCl con solución Hoagland. Al control negativo solo se le agrego Hoagland.

- **Recolección de muestras.**

Después de un mes de aplicar el tratamiento salino se retiró el suelo de la raíz, la plántula se separó en la parte aérea y radicular y se puso a secar a 50°C por 3 días, se midió el peso seco del vástago y la raíz.

5.3.3 Objetivo 3

Caracterizar los mecanismos de acción de las rizobacterias con actividad promotora de crecimiento en plántulas de tomate.

- **Variable independiente:** Rizobacterias seleccionadas.

- **Variable dependiente:** Solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y ácido indolacético

- **Indicadores:**

***Solubilización de PO_4**

Cualitativo: Presencia del índice de solubilización.

Cuantitativo: Solubilización de fosfatos, pH ácido.

*** Fijación de Nitrógeno**

Cualitativo: Crecimiento y viraje del medio sólido.

Cuantitativo: Aerófilas: Turbidez del medio líquido.

Microaerófilas: Formación de película (crecimiento bacteriano) y detección de NH_4^+ .

***Ácido indolacético**

Cualitativo: Reacción colorimétrica con reactivo de Salkowsky.

Cuantitativo: Cuantificación mediante espectrofotometría

Técnicas Se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar la solubilización de fosfatos (PO_4), fijación de nitrógeno y ácido indolacético.

5.3.3.1. Actividad Solubilizadora de Fosfatos.

Método Cualitativo.

Se realizó el ensayo en medio sólido SRS con controles positivo (PA0 y AZP) y control negativo (medio sin inocular). De cada cepa se tomó una colonia de 48 horas de crecimiento en agar Nutritivo, se sembró por punción en medio SRS, se incubó a 37°C por cinco días. Luego, se registró la acidificación del medio, el diámetro de las colonias y los halos de solubilización. Cada aislamiento se evaluó por triplicado

Método Cuantitativo.

Las rizobacterias que solubilizaron el fosfato en el medio SRS sólido se evaluaron en medio líquido. Se realizó un pre-inóculo en caldo nutritivo, se ajustó el inóculo a 0,2 Abs 600nm, se agregaron 0,3 ml del inóculo ajustado y 7,0 ml de medio líquido SRS (sin indicador de pH) a un tubo Falcón de 50 ml. Los tubos se incubaron a 37°C por 8 días a 200 rpm. Posteriormente, se midió el pH, biomasa y fosfato soluble (PO_4^{3-}) por espectrofotometría a 420 nm. Cada aislamiento se evaluó por duplicado.

5.3.3.2 Fijación de nitrógeno:

Método cualitativo.

Para estimar la actividad fijadora de nitrógeno, se realizó un ensayo en medio sólido carente de nitrógeno con una fuente combinada de carbono (NFb), donde solo crecen microorganismos con el sistema enzimático para reducir el nitrógeno atmosférico. Las cepas seleccionadas en el primer bioensayo se activaron en Agar Nutritivo por 24 horas. Las colonias se sembraron por estría en la superficie del agar NFb, se incubaron por 5 días a 37°C, luego se observó crecimiento y el viraje del medio.

Método Cuantitativo.

Diazótrofos Aeróbicos.

Los aislamientos positivos para crecimiento en NFb se activaron en caldo nutritivo, se ajustó el inóculo a 0,2 Abs (600nm), se agregaron 0,2 ml del ajuste con 7,0 ml de medio líquido NFb (sin indicador de pH), en tubos Falcón de 50 ml; se incubó a 37°C por 5 días a 200 rpm. Posteriormente, se observó viraje del medio y turbidez. Se determinó la biomasa mediante peso seco del pellet. El NH₄ liberado al medio se cuantificó por espectrofotometría a 525nm.

5.3.3.3 Ácido indolacético.

Medición cualitativa.

Se siguió la metodología propuesta por Glickmann 1995 y Dobbelaere 1999. Las cepas se sembraron en agar nutritivo suplementado con L-triptófano durante 48 horas. Luego, se colocó papel de nitrocelulosa estéril en la superficie de las colonias bajo oscuridad se incubaron por 24 horas más, se retiró el papel y se adicionaron dos gotas del reactivo de Salkowsky. Una reacción positiva se observa una coloración rosada que nos indica presencia de índoles.

Medición cuantitativa.

Se preparó un pre inóculo en 5 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37°C por 24h a 150 rpm. Se evaluó cada cepa por triplicado. Se centrifugaron los tubos Falcón a 6500 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se ajustó el inóculo bacteriano a una densidad óptica de $0,2 \pm 0,05$ a 600 nm en ADE.

Se adiciono 100 µl del inóculo en frascos ámbar (mantener oscuridad durante el periodo de incubación, así evitar la degradación del AIA) en 9 ml de caldo nutritivo

suplementado con 1 ml de L-triptófano 0,3mM. Se incubó a 37°C con a 150 rpm por 3 días (72 horas).

Posteriormente se dispuso 1ml de muestra en tubos Eppendorf de 1.5ml, se centrifugó a 10.000 rpm por 2 min. En un tubo Eppendorf se agrega 700µl del sobrenadante con 700µl del reactivo de Salkowsky. Se dejó reaccionar 30 min en oscuridad.

Leer absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro. A las lecturas superiores a 1 absorbancia se realizó dilución del sobrenadante en medio de crecimiento. El blanco es caldo nutritivo suplementado con 1 ml de L-triptófano 0.3mM con Reactivo de Salkowsky. Se realizó la cuantificación de ácido indolacético a través de la curva de calibración.

El control positivo es la cepa *Azospirillum lipoferum*. El testigo es caldo nutritivo suplementado con L-triptófano sin inóculo alguno.

5. RESULTADOS.

5.1 Seleccionar rizobacterias con actividad promotora de crecimiento en plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero.

Se realizaron cinco bioensayos en plántulas de tomate para evaluar la promoción de crecimiento vegetal; se evaluó en crecimiento en plántulas de tomate; el primer ensayo se realizó inoculando previamente la semilla y sembrándola directamente en suelo no estéril (anexo 10), el segundo ensayo se inocularon las semillas de tomate con las rizobacterias y se sembraron en turba estéril (anexo 11) el tercer ensayo se sembraron las semillas en suelo , luego de observar el crecimiento de las plántulas hasta las hojas verdaderas y se realizó el inoculo (anexo 12), el cuarto ensayo se realizó en semilleros una siembra de plántulas de tomate , hasta tener hojas verdaderas y se realizó el trasplante a suelo no estéril (anexo 13) .el quinto ensayo se realizó nuevamente el cuarto ensayo y se obtuvieron los siguientes resultados que fueron seleccionados por la respuesta de promoción de crecimiento vegetal :

Tabla 1. Efecto de la inoculación bacteriana sobre el peso seco de vástago, raíz y total en plántulas de tomate.

Morfotipos	Vástago $\pm$ SE (mg)	LSD	%	Raíz $\pm$ SE (mg)	LSD	%	Total $\pm$ SE (mg)	LSD	%
TN26	4,33 $\pm$ 0,17	a	235	1,37 $\pm$ 0,22	dcbase	71	5,70 $\pm$ 0,35	A	172
TN503	4,23 $\pm$ 0,15	a	227	1,43 $\pm$ 0,12	cba	78	M 5,67 $\pm$ 0,26	A	171
TN333	4,20 $\pm$ 0,09	a	225	1,15 $\pm$ 0,25	fedcb	43	5,35 $\pm$ 0,26		155
TN106	3,33 $\pm$ 0,44	cb	158	1,67 $\pm$ 0,17	A	108	5,00 $\pm$ 0,58	ba	139
59 A	3,10 $\pm$ 0,33	dcb	140	1,47 $\pm$ 0,21	ba	83	4,57 $\pm$ 0,34	cb	118
76D	3,55 $\pm$ 0,17	b	175	0,63 $\pm$ 0,13	kjih	-21	4,18 $\pm$ 0,05	dcb	100
TN1035	3,14 $\pm$ 0,11	dcb	143	1,04 $\pm$ 0,07	hgfedc	30	4,18 $\pm$ 0,09	dc	100
TN62	3,15 $\pm$ 0,35	dcb	144	0,95 $\pm$ 0,15	kjihg fedcb	18	4,10 $\pm$ 0,20	fedcb	96
59C	2,70 $\pm$ 0,13	fed	109	1,39 $\pm$ 0,12	cba	73	4,09 $\pm$ 0,16	dc	95
77 A	2,70 $\pm$ 0,10	hg fedc	109	1,30 $\pm$ 0,30	fedcba	62	4,00 $\pm$ 0,40	g fedc	91
C31	2,93 $\pm$ 0,05	edc	127	1,05 $\pm$ 0,16	ihg fedc	31	3,98 $\pm$ 0,19	fedc	90
TN80	2,69 $\pm$ 0,18	gfed	108	1,23 $\pm$ 0,16	edcba	53	3,91 $\pm$ 0,20	fed	87
TN1034	2,38 $\pm$ 0,24	ihgfe	84	1,10 $\pm$ 0,11	gfedcb	37	3,48 $\pm$ 0,29	hg fed	66
76B	2,62 $\pm$ 0,22	hg fed	103	0,66 $\pm$ 0,05	kjih	-17	3,28 $\pm$ 0,19	ihgfe	56
TN98	2,70 $\pm$ 0,14	gfed	109	0,55 $\pm$ 0,11	k	-31	3,25 $\pm$ 0,16	jihg	55
PA0	2,22 $\pm$ 0,36	jihg	72	0,93 $\pm$ 0,14	jihg fed	16	3,15 $\pm$ 0,48	kjihg	50
AZP	2,18 $\pm$ 0,24	jih	68	0,90 $\pm$ 0,21	kjihg fed	12	3,08 $\pm$ 0,34	lkjih	47
TN42	2,05 $\pm$ 0,05	kjih	58	1,00 $\pm$ 0,10	kjihg fedcb	25	3,05 $\pm$ 0,05	lkjihg	45
TN152	2,22 $\pm$ 0,26	jihgf	72	0,82 $\pm$ 0,08	kjihgf	2	3,04 $\pm$ 0,26	lkjih	45
C47 A	1,87 $\pm$ 0,18	kji	44	1,13 $\pm$ 0,11	fedcb	41	3,00 $\pm$ 0,21	lkjih	43

TN81	1,75 ± 0,25	mlkji	35	1,25 ± 0,05	gfedcba	56	3,00 ± 0,20	lkjihg	43
77C	1,93 ± 0,05	kji	49	1,03 ± 0,15	ihgfedc	28	2,95 ± 0,19	lkjih	41
TN91	2,08 ± 0,08	jih	61	0,80 ± 0,08	kjihgf	0	2,88 ± 0,15	lkjih	31
TN65	1,90 ± 0,26	kji	47	0,90 ± 0,06	kjihgfed	12	2,80 ± 0,32	lkjih	33
TN67	1,93 ± 0,05	kji	49	0,88 ± 0,21	kjihgfe	10	2,80 ± 0,23	lkjih	33
TN107	1,95 ± 0,05	kjih	51	0,80 ± 0,20	kjihgfe	0	2,75 ± 0,25	nmlkjih	31
TN14	1,63 ± 0,09	mlkj	26	1,07 ± 0,07	ihgfedcb	33	2,70 ± 0,10	mlkjih	29
77D	2,07 ± 0,07	jih	60	0,60 ± 0,17	kjih	-25	2,67 ± 0,19	mlkjih	27
76C	1,65 ± 0,15	mlkji	27	0,95 ± 0,05	kjihgfedcb	18	2,60 ± 0,10	nmlkjih	24
59D	1,77 ± 0,12	mlkji	37	0,80 ± 0,06	kjihgfe	0	2,57 ± 0,18	nmlkji	22
59B	1,75 ± 0,21	mlkj	35	0,80 ± 0,08	kjihgf	0	2,55 ± 0,27	nmlkj	22
TN68	1,42 ± 0,16	mlk	10	1,04 ± 0,12	hgfedc	30	2,46 ± 0,15	nml	17
TN89	1,93 ± 0,15	kji	49	0,53 ± 0,11	kj	-33	2,45 ± 0,16	nmlk	17
77B	1,70 ± 0,23	mlkj	31	0,70 ± 0,09	kjihg	-12	2,40 ± 0,25	nml	14
C-	1,29 ± 0,10	m	0	0,80 ± 0,11	kjihg	0	2,09 ± 0,15	nm	0
TN151	1,20 ± 0,06	mi	-6	0,57 ± 0,12	kj	-28	1,77 ± 0,18	n	-15

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum sp*

Treinta y cinco rizobacterias se evaluaron en plántulas de variedad Rio Grande bajo condiciones de invernadero, 11 aisladas de la rizósfera de lechuga, 22 de papa y dos controles positivos (PA0 y AZP). Como parámetros de crecimiento se tomaron los pesos secos de raíz, vástago y total de la plántula.

Se evidenció que 34 aislamientos generaron aumento de peso seco en vástago, 28 en raíz y 34 en el peso seco total; corresponde a: 97.1%, 80% y 97.1% respectivamente (Tabla 1). Con respecto al incremento de peso seco de vástago, tres aislamientos incrementaron más del 200%, dos aislamientos en un rango entre 150-200%, nueve entre 100-150%, ocho entre el 50-100% y 12 de 0-50%. En el incremento de peso seco de raíz, un aislamiento incremento más del 100%, siete aislamientos entre 50-100% y 19 de 0-50%. Siete aislamientos estuvieron por debajo del control negativo con un -12 a -33%. En el peso seco total, tres aislamientos incrementaron entre 150-200%, cuatro entre 100-150%, nueve entre el 50-100%, 18 de 0-50%. El tratamiento TN151 estuvo por debajo del control negativo con -15%.

52. Determinar la respuesta al estrés salino en plántulas de tomate al inocularse con PGPR.

Los cuatro mejores aislamientos en las variables de peso seco en vástago, raíz y total TN503, TN333 y TN106, representados en la Tabla 1 se evaluaron a 0 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM NaCl en plántulas de tomate.

Los aislamientos TN106 y TN 503 obtuvieron mayor incremento en peso seco de vástago raíz y total (61,62-59,73 %) representadas con LSD a (Tabla 2). El aislamiento TN26 presentó el menor incremento 13,8, 95,4 y 24,3% en los pesos secos de vástago, raíz y total respectivamente. Este tratamiento presentó resultados similares al control *Azospirillum sp* y al control negativo representados con LSD b.

Tabla 2. Crecimiento de plántulas de tomate al inocularse con PGPR sin estrés salino.

Morfotipos	Vástago ± SE (mg)	LSD	%	Raíz ±SE (mg)	LSD	%	Total ±SE (mg)	LSD	%
TN106	4,62 ±0,11	a	41,72	1,36 ± 0,1	A	209,09	5,98 ± 0,15	a	61,62
TN503	4,57 ± 0,3	a	40,18	1,34 ± 0,19	A	204,55	5,91 ± 0,49	a	59,73
PA0	3,74 ± 0,45	b	14,72	0,86 ± 0,05	B	95,45	4,6 ± 0,47	cb	24,32
TN26	3,71 ± 0,17	b	13,80	0,84 ± 0,07	C	90,91	4,55 ± 0,23	cb	22,97
TN333	3,98 ± 0,39	ba	22,09	0,46 ± 0,06	B	4,55	4,44 ± 0,44	b	20,00
AZP	3,41 ± 0,33	b	4,60	0,47 ± 0,12	C	6,82	3,88 ± 0,36	cb	4,86
C(-)	3,26 ±0,14	b	-	0,44 ± 0,07	C	-	3,7 ± 0,17	c	

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum sp*

Tabla 3. Crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con PGPR a 50 mM NaCl

Morfotipos	Vástago ± SE (mg)	LSD	%	Raíz ±SE (mg)	LSD	%	Total ±SE (mg)	LSD	%
PA0	4,73 ± 0,005	a	49,68	0,64 ± 0,05	b	77,78	5,36	a	52,27
TN106	3,79 ± 0,05	b	19,94	1,49 ± 0,08	a	313,89	5,28	a	50,00
TN503	3,43 ± 0,03	c	8,54	0,37 ± 0,02	c	2,78	3,80	b	7,95
C(-)	3,16 ± 0,09	d	0	0,36 ± 0,05	cb	0	3,52	cb	0
TN26	2,78 ± 0,1	d	-12,02	0,58 ± 0,04	b	61,11	3,36	cb	- 4,55
TN333	2,84 ± 0,09	d	-10,12	0,29 ± 0,04	c	-19,44	3,13	c	-
									11,08
AZP	2,63 ± 0,54	bcd	-16,77	0,39 ± 0,1	cb	8,33	3,01	cb	-
									14,49

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum sp*

El aislamiento TN106 obtuvo incremento en plántulas de tomate sometidas a 50 mM NaCl en peso seco de vástago (19,9) raíz (313,8) y total (50,0%). PA0 presentó

incremento e a promoción de crecimiento vegetal similar a el aislamiento TN 106, Mientras que los aislamientos TN 26, TN 333, AZP presentaron valores similares al control negativo representado con LSD cb en el peso seco total.

Tabla 4. Crecimiento en plántulas de tomate inoculadas con PGPR a 100 mM NaCl.

Morfotipos	Vástago ± SE (mg)	LSD	%	Raíz ± SE (mg)	LSD	%	Total ±SE (mg)	LSD	%
TN503	4,54 ± 0,31	a	59,86	1,00 ± 0,07	b	127,27	5,54 ± 0,37	a	68,90
PA0	4,36 ± 0,09	ba	53,52	1,33 ± 0,15	a	202,27	5,69 ± 0,12	a	73,48
TN26	4,02 ± 0,2	cb	41,55	0,49 ± 0,04	d	11,36	4,51 ± 0,23	b	37,50
AZP	3,53 ± 0,19	c	24,30	0,50 ± 0,04	c	13,64	4,03 ± 0,17	cb	22,87
C(-)	2,84 ± 0,12	d	0	0,44 ± 0,03	cd	0	3,28 ± 0,11	d	0
TN106	2,83 ± 0,05	d	- 0,35	0,37 ± 0,02	d	-15,91	3,20 ± 0,06	d	-2,44
TN333	2,77 ± 0,12	d	- 2,46	0,64 ± 0,04	c	45,45	3,41 ± 0,11	dc	3,96

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum*

Los aislamientos TN 503, PA0 Y TN26 fueron estadísticamente significativo en el peso seco de vástago, raíz y total. promoviendo el crecimiento vegetal de las plántulas de tomate a una concentración de 100mM NaCl. Mientras que los aislamientos TN 33 Y TN 106 fueron estadísticamente poco significativas en comparación de medias con el control negativo.

Tabla 5. Crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con PGPR a 200 mM NaCl.

Morfotipos	Vástago ± SE (mg)	LSD	%	Raíz ±SE (mg)	LSD	%	Total ±SE (mg)	LSD	%
TN503	4,97 ± 0,35	a	28,42	1,10 ± 0,08	a	103,70	6,07	a	37,64
TN106	4,28 ± 0,16	ba	10,59	1,02 ± 0,04	a	88,89	5,30	ba	20,18
TN26	4 ± 0,2	cb	3,36	0,76 ± 0,09	b	40,74	4,76	b	7,94
TN333	3,97 ± 0,29	cb	2,58	0,72 ± 0,09	ab	33,33	4,69 ± 0,27	cb	6,35
PA0	3,95 ± 0,22	cb	2,07	0,67 ± 0,04	cb	24,07	4,62 ± 0,25	cb	4,76
C(-)	3,87 ± 0,29	cb	0	0,54 ± 0,08	dc	0	4,41 ± 0,3	dc	0
AZP	3,20 ± 0,3	c	-17,31	0,35 ± 0,03	d	-35,19	3,55 ± 0,29	d	-19,50

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular, (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum*

Los aislamientos TN503 y TN106 fueron significativos estadísticamente para las cuatro variables analizadas en el peso seco en vástago, raíz y total en plántulas de

tomate sometidas a 200 mM NaCl. El aislamiento TN 26 presentó valor significativo en el peso seco de la raíz y total, mientras que los controles PA0 y *Azospirillum* tuvieron valores similares estadísticamente al control negativo.

5.3 Caracterizar los mecanismos de acción de las rizobacterias con actividad promotora de crecimiento en plántulas de tomate.

Producción de ácido indolacético (AIA).

Determinación cualitativa y cuantitativa.

En la evaluación cualitativa, la producción de ácido indolacético de las rizobacterias TN26, TN106, TN333, TN503 fue negativa, PA0 dio una reacción débilmente positiva, se tomó como control positivo *Azospirillum*. Posteriormente, se realizó una determinación cuantitativa mediante espectrofotometría.

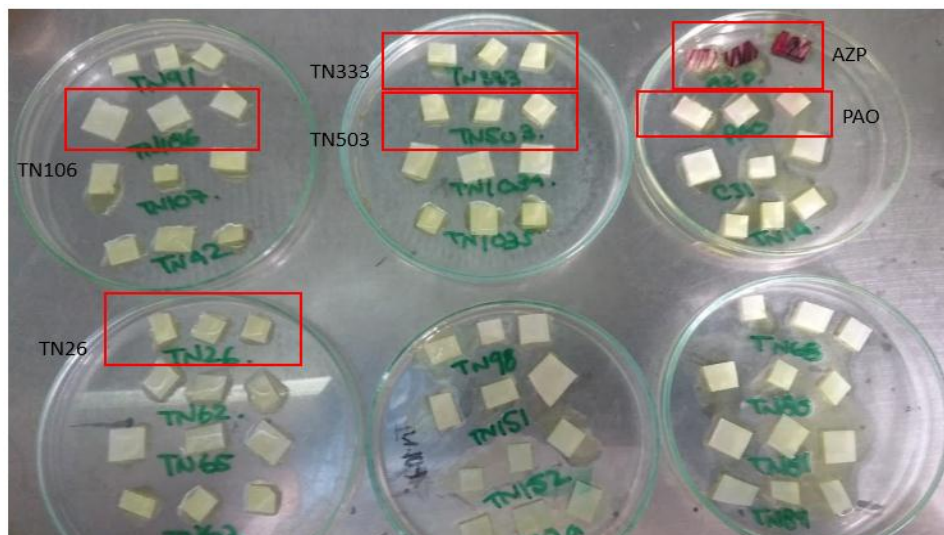


Fig. 2. Revelación con reactivo Salkowsky de la prueba cualitativa de ácido indolacético (AIA). Los morfotipos de interés se demarcan con un rectángulo rojo los cuales no presentaron evidente de color, son presuntamente negativos, con excepción de PA0 (*P. aeruginosa*) que se evidencio una reacción débilmente

positiva. AZP (*Azospirillum lipoferum*) es el control positivo de la prueba el cual mostró un cambio de color a rosa intenso.

Tabla 6. Producción de ácido indolacético por PGPR.

Aislamientos	Método cualitativo	Concentración de AIA $\pm$ SE (μ g/ml)	LSD
PA0	+	13,74 $\pm$ 0,63	a
AZP	+	7,41 $\pm$ 1,56	b
TN26	-	4,44 $\pm$ 0,79	cb
TN106	-	1,58 $\pm$ 0,07	d
TN503	-	0,94 $\pm$ 0,29	dc
TN333	-	0,50 $\pm$ 0,12	dc
C(-)	-	--	--

(+): positivo, (-) negativo, (AIA): ácido indolacético (%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular, (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum*, control positivo

Los morfotipos PA0 y *Azospirillum lipoferum* se utilizaron como control positivo teniendo valores estadísticamente superiores la concentración de auxinas. el aislamiento que presentó estadísticamente relevante es la TN 26 (LSD:cb) con una concentración de 4,44 μ g/ml, y los aislamientos TN 106 ,TN 503 Y TN 333 presentaron valores similares estadísticamente y de poca relevancia en la producción de ácido indolacético.

Solubilización de fosfatos cualitativa y cuantitativa.

Los medios SRS evidenciaron solubilización de fosfatos por la presencia del halo generado alrededor de la colonia sembrada. Se utilizó como control positivo *Azospirillum lipoferum*; cuyo radio de solubilización fue de 150 mm. El ensayo es positivo para todas las cepas de interés (TN26, TN106, TN333, TN503 y PA0) que acidificaron el medio y presentaron halo de solubilización. La solubilización de fósforo estuvo acompañada de acidificación del medio, detectada por el viraje de color del indicador de pH, azul de bromo timol en las cepas solubilizadoras. Se realizó a las cepas la prueba cuantitativa de producción de PO₄.

En la tabla 7. Se observa el ensayo preliminar mediante el uso del medio SRS sólido se observó, crecimiento de la cepa, viraje de medio y halo de solubilización. El aislamiento TN26 tuvo un mayor halo de solubilización respecto al control positivo (PA0), pero una menor producción de PO₄ en el medio SRS líquido, donde la mayor producción en mg/ml la presentó PA0. Los cuatro aislamientos seleccionados presentaron una producción de PO₄, el morfo tipo PA0 presentó el valor estadísticamente más representativo entre os aislamientos estudiados, el aislamiento TN 333, AZP, TN 26 , TN 106 Y TN 503 presentaron valores similares estadísticamente en un rango de 32,03-35,5 mg/ml de PO₄.

Tabla 7. Actividad de bacterias solubilizadora de fosfato en medio SRS sólido y líquido.

morfotipos	Ensayo Preliminar Solubilización de PO ₄	Área promedio de colonia (mm ²)	Área promedio halo de solubilización (mm ²)	Índice de Solubilización	pH	PO ₄ mg/ml ± SE	LSD
PA0	+	45	150	3,33	4,82	63,91 ± 0,19)	a
TN333	+	42	75	1,79	5,35	35,5 ± 0,21	b
AZP	+	56	72	1,29	4,90	34,68 ± 0,03	b
TN 26	+	44	168	3,82	4,80	35,35 ± 1,04	b
TN106	+	81	120	1,48	4,80	33,98 ± 0,15	cb
TN503	+	24	108	4,50	5,21	32,03 ± 0,11	c
C(-)	-	--	--	-	7,00	--	--

(+): Positivo, (-) negativo, (SRS): Medio de solubilización de fosfatos, (PO₄): fosfato inorgánico, (SE): error estándar. (C-): Control negativo, plantas sin inocular, (PA0): *P. aeruginosa*, control positivo, (AZP): *Azospirillum lipoferum*

Fijación de nitrógeno cualitativa y cuantitativa

Todas las cepas de interés (TN26, TN106, TN333, TN503 y PA0) presentaron crecimiento en el medio NFB, indica potencialidad como microorganismo fijador biológico de N₂. El aislamiento TN26 presentó la mayor producción de amonio (Tabla 8). Sin embargo, todos los aislamientos presentaron mayor producción de amonio respecto al control negativo en medio líquido NFb en condiciones aerobias.

En condiciones microaerófilas todas las cepas presentaron crecimiento en medio NFb semisólido y las cepas TN333, TN503, PA0 y AZP presentaron formación de película.

En la producción de amonio el aislamiento con mayor producción fue la TN 26 con 27,67 ppm y la que tuvo menor producción fue TN 503 con un valor de 17,64 ppm teniendo como control PA0 y AZP (15,7 y 12,4 ppm) con valores inferiores a los de los aislamientos indicándonos una buena producción de nitrógeno de los aislamientos.

Tabla 8. Crecimiento de PGPR en medio NFb y producción de amonio							
Morfo tipos	Ensayo inicial	Diazótrofos Aerobios				Diazótrofos Microaerófilos	
	Viraje del medio NFb	Biomasa (ug)	Viraje medio líquido NFb	pH	NH ₄ ⁺ ± SE ppm	LSD	Crecimiento en medio NFb semisólido
TN 26	+	31,55	+	7,68	27,67 ± 0,37	a	+
TN106	+	7,35	+	8,01	22,33 ± 0,27	b	+
TN333	+	9,7	+	8,00	19,34 ± 0,27	c	(P) +
TN503	+	48,25	+	8,12	17,64 ± 0,17	d	(P)+
PA0	+	80,65	+	7,86	15,7 ± 0,07	e	(P) +
AZP	+	2,8	+	7,57	12,45 ± 0,07	f	(P) +
C(-)	-	0	-	6,91	---	--	-
(+): Positivo cambio del color del medio a amarillo, (-) negativo sin ningún cambio de color del medio (P): con formación de película, (NFb): Medio libre de nitrógeno, (NH ₄ ⁺): amonio, (SE): error estándar. (C-): Control negativo, plantas sin inocular, (PA0): <i>P. aeruginosa</i> , (AZP): <i>Azospirillum lipoferum</i> , control positivo, .(---): no se realizó							

6. DISCUSIÓN.

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal desempeñan importantes funciones beneficiosas que influyen de una manera directa o indirecta en el crecimiento y desarrollo de las plantas (53). Cada vez son más utilizadas las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal a nivel agrícola, debido a la eficiencia como biofertilizantes, bajo costo, ausencia de alteraciones al medio ambiente, tanto en flora como en la fauna (54).

Se evaluaron 35 rizobacterias, 22 fueron aisladas de suelo rizosférico de papa y 11 de lechuga, junto a dos controles positivos *P. aeruginosa* y *Azospirillum lipoferum*. Los aislamientos se sometieron a un ensayo preliminar para seleccionar las que presentaban mayor promoción de crecimiento en las plántulas de tomate. Esto permitió seleccionar las cuatro cepas más prometedoras.

En el primer ensayo de invernadero se evidenció que las rizobacterias tuvieron un efecto positivo como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal donde el 97.1% de las cepas evidenciaron un aumento del peso seco de vástago (97,1%), peso seco de raíz (80%) y en peso seco total (97.1%) respecto al control negativo, el 68,9% de las cepas mostraron un incremento de las variables mayor al 50% respecto al control negativo en peso total en plántulas de tomate. Ghyselinck et al (13) evaluaron 585 aislamientos de ocho campos de papa en los Andes. El 10% de los aislados fueron antagonistas para la supresión de *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* y pudieron solubilizar fosfato, producir AIA, ACC desaminasa, NH₃ y cianuro de hidrógeno (HCN). Durante los experimentos de crecimiento, 23 aislados antagonísticos se asociaron a la promoción del crecimiento de la planta y/o la supresión de la enfermedad. Tres aislamientos promovieron significativamente el crecimiento en plántulas sanas en comparación con la cepa comercial (control), siete cepas superaron a la cepa comercial en plántulas enfermas de *R. solani in vitro* (13).

Aproximaciones similares han sido reportadas en rizobacterias en semillas y plántulas de tomate. Martínez et al (55) registró un aumento en la biomasa en 37 y 16% en plántulas de tomate y pimiento mediante la inoculación de cepas pertenecientes al género *Bacillus*. De igual manera Cendales et al (56) demostraron un aumento en plántulas de tomate en peso seco de vástago del 27,1% y de peso seco de raíz del 18,0% posterior a la inoculación con *Bacillus subtilis* (57,56).

Una de las mayores limitantes en el desarrollo de los biofertilizantes es la inconsistencia de la reproducibilidad de los resultados en promoción de crecimiento (Okon y Labandera, 1994). Kloepper (9) inoculó 887 bacterias en plántulas de canola en condiciones de invernadero, reportó que el 25.7% de las bacterias promovieron el crecimiento con respecto a los controles, tan solo el 3.94% aumentaron la promoción en al menos dos repeticiones. En este trabajo 34 de los 35 aislamientos generaron aumento de peso seco en las plántulas de tomate. Se evidenció que 72,7% de los 35 aislamientos iniciales aumentaron la promoción en 4 repeticiones (Tabla 1, anexos 10, 11, 12 y 13). Martínez et al (57) encontraron que los *Bacillus sp.* MA04 y MA17, aumentaron el porcentaje de germinación en semillas de tomate en un 5 y 6%, mientras que los *Bacillus sp* MA06 y MA12 incrementaron el peso de las plántulas hasta en un 17 y 20%. En semillas de pimiento, la cepa MA06 incrementó el porcentaje de germinación en 7%; MA12 y MA17 incrementaron la biomasa hasta en un 37 y 16%(58).

La literatura nos muestra como la inoculación bacteriana se ha limitado a un número muy reducido de especies, cuyos mecanismos de acción son muy estudiados(47). Por ejemplo, se selecciona generalmente *Azospirillum spp* por la capacidad de producir auxinas y fijar nitrógeno (58,59); *Bacillus spp* por la capacidad productora de auxinas, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos y las *Pseudomonas fluorescens* por la acción antagónica frente a patógenos (60). En este estudio, las cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal se clasificaron como

Citrobacter freundii (TN26), *Pseudomonas chlororaphis* (TN106), *Serratia sp* (TN333) y *Pseudomonas chlororaphis* (TN503) aisladas de rizósfera de papa. Estos aislamientos son bacilos Gram negativos móviles y podrían desempeñar un papel importante en la colonización competitiva en las raíces.

Las plántulas de tomate inoculadas mejoraron significativamente la emergencia y crecimiento de las plántulas en 97,1%. Varios mecanismos de acción podrían mejorar de manera indirecta la germinación de la semilla. Begum et al. (61) uno de los mecanismos de acción más reportados es la producción de fitohormonas como el ácido indolacético. Patten y Glick (62) reportan que la producción de ácido indolacético bacteriano mejora el desarrollo de la raíz en plantas hospedadoras. Ellos encontraron que las raíces primarias de plántulas de canola tratadas con *P. putida* silvestre GR12-2 fueron en promedio 35 a 50% más largas que las raíces tratadas con el mutante deficiente de ácido indolacético y las raíces de las semillas sin inocular (62). En este estudio todos los aislamientos fueron productores de ácido indolacético con rangos de 0,50 – 4,44 µg/ml; los controles PA0 y AZP presentaron una producción de ácido indolacético de 13,7 y 7,41 µg/ml respectivamente. Estudios similares demostraron que la producción de ácido indolacético es común entre las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (57–59). Los aislamientos en este estudio produjeron una cantidad similar de ácido indolacético que las cepas evaluadas por Zahid et al (65), entre 0,9 – 5,3 µg/ml, pero menor a la producida de las cepas trabajadas por Yasmin et al y Sariah et al (57, 59), que se encuentran en un rango de 30,6 – 50,0 y 42,3 – 52,28 µg/ml, respectivamente. El ácido indolacético promueve el desarrollo de la raíz, la absorción de nutrientes y coordina la demanda y la adquisición de nitrógeno (66,67).

La fijación de nitrógeno desempeña un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas. Los cuatro aislamientos crecieron en medio NFb y produjeron amonio, indicadores de la capacidad para fijar N. En general, estos aislamientos tuvieron mayor crecimiento en ensayos cualitativos en comparación a

los controles positivos *Azospirillum* y PA0. La producción de amonio fue cercana entre las rizobacterias con valores entre 17,6; 19,3; 22,3 y 27,6 ppm (Tabla 8) Valores bajos según los reportados por León (2014) con producciones hasta de 41,67 ppm (68). Sin embargo, las cepas evaluadas presentaron una mayor producción de amonio entre 17,64 a 27,67 ppm comparado a los controles positivos. *Azospirillum* que presentó una producción de 12,4 ppm y PA0 de 15,6 ppm de amoníaco (69).

La producción de amonio y el crecimiento en medios NFb puede relacionarse la con la ganancia de biomasa vegetal. Marques et al (70) reportan que las bacterias productoras de amonio suministran nitrógeno a la planta huésped. Sin embargo, la producción excesiva de amoníaco aumenta la virulencia de patógenos oportunistas en las plantas. La producción de amonio también juega un papel importante en la producción de ácido cianhídrico (HCN) el cual juega un papel esencial en la supresión de la enfermedad de las plantas (14).

Las rizobacterias presentaron actividad solubilizadora de P. En términos generales, los aislamientos solubilizaron entre 32,0 - 35,5 mg/ml de P, inferior a lo generado por PA0 con 63,9 mg/ml quien presentó la producción de PO_4 con mayor significancia estadística, pero superior a lo reportado por Anwar et al. (14) con valores entre 1,25 - 21,5 mg/ml de P. Los cuatro aislamientos presentaron una actividad solubilizadora de fosfatos similar entre ellos, curiosamente la promoción de crecimiento vegetal también es similar entre los cuatro morfotipos. El aislamiento TN333 solubilizó 35,5 mg/ml de PO_4 y obtuvo un peso seco total de 5,35 mg, TN26 solubilizó en 35,35 mg/ml y obtuvo un peso seco total de 5,70 mg, TN106 solubilizó en 33,98 mg/ml y obtuvo un peso seco total 5,00 mg, finalmente el aislamiento TN503 solubilizó en 32,03 y obtuvo un peso seco total 5,67 mg. Anwar et al evidenció que la cepa con mayor producción de PO_4 (WA1 72,13mg/100ml) presentó el menor peso seco (2.81g) en comparación de las demás cepas de su estudio que presentaron menor producción de PO_4 pero mayor promoción de crecimiento (14).

Las rizobacterias promueven el crecimiento de las plantas y alivian el estrés salino que disminuye el desarrollo y rendimiento de las mismas (71). Aquí se sometieron plántulas de tomate a 50, 100 y 200 mM de NaCl que posteriormente fueron inoculadas con los cuatro aislamientos que presentaron la mejor promoción de crecimiento vegetal. La mitigación del estrés salino fue dependiente de la concentración de NaCl. En las plántulas sometidas a 50 mM de NaCl se encontró que tres aislamientos (PA0, TN106 y TN503) presentaron un incremento en peso seco total por encima del control negativo y fueron estadísticamente significativos el aislamiento TN106 tuvo el mayor incremento porcentual en las variables de peso seco en vástago, raíz y total (19,9; 313,8 y 50,0%). El aislamiento TN503 presentó un incremento de peso seco total del 7,95% en comparación con el control negativo. Las plántulas sometidas a 100 mM NaCl presentaron un mejor comportamiento en el aislamiento TN503 con un incremento de 59,8% en peso seco de vástago, 127,27% en raíz y 68,90% en el peso seco total, el aislamiento TN26 presentó un incremento de peso seco en vástago (41,55%), en raíz (11.36%) y total (37,5%); los controles PA0 y AZP presentaron valores en peso seco superiores al control negativo, sin embargo, solo PA0 tiene significancia estadística. Las plántulas sometidas a 200 mM NaCl presentaron un incremento en peso secos en los cuatro aislamientos de interés (TN503, TN106, TN26 y TN333) así como la cepa control PA0, Las cepas que presentan significancia estadística son las cepas TN503, TN106 y TN26. El aislamiento TN 503 presentó promoción de crecimiento vegetal con un peso seco total del 37,64%, el aislamiento TN106 presentó un peso seco total del 20,18 %, TN26 y TN 333 tuvieron menores pesos secos total con valor de 7,94 y 6,35 respectivamente, pero superiores al control negativo. Bharti et al (19) demostraron que la rizobacteria *Dietzia natronolimnaea* protege las plantas de trigo del estrés salino mediante la estimulación de la expresión de genes relacionados con el estrés, permiten la expresión de varias enzimas antioxidantes como *APX*, *MnSOD*, *CAT*, *POD*, *GPX* y *GPR* transportadores de iones, maquinaria antioxidante que contribuyó a una mayor tolerancia al estrés por salinidad (19). Karlidag et al (16)

sugieren que las inoculaciones de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal podrían aliviar los efectos nocivos de las condiciones de estrés salino en el crecimiento y el rendimiento de las plantas de fresa. Sánchez y Bonilla (49) establecieron que la inoculación de los aislamientos promotores de crecimiento vegetal *Pantoea deleyi* (ACSA12), *Enterobacter amnigenus* (ACSA14) y *Serratia liquefaciens* (ACSA19) alivianan los efectos bajo condiciones de estrés salino, por tanto identificar microorganismos que podrán ser eficientes en la promoción de crecimiento, rendimiento de leguminosas como *Acacia decurrens* bajo condiciones de estrés salino en campo, fenómeno que se está incrementando en suelos del altiplano CundiBoyacense y que disminuye la productividad de los sistemas ganaderos por salinidad en campo (17). Habib et al (18) demuestran que las plantas de quimbombó inoculadas con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal productoras de ACC desaminasa mostraron una mayor biomasa de raíces y brotes que las plantas no inoculadas bajo estrés por salinidad. Esto podría deberse a que la producción de ACC desaminasa alivian los efectos de la salinidad en las plantas de quimbombó.

En este estudio se logró aumentar el crecimiento de plántulas de tomate a partir de aislamientos nativos obtenidos de cultivos papa y lechuga, se evidenció que 34 de los 35 aislamientos presentaron un incremento en las variables en peso total; sin embargo solo fueron seleccionados cuatro aislamientos, quienes presentaron el mayor incremento en pesos secos, estas presentaron un incremento en peso seco total superior al 130% respecto al control negativo, sé evidencio que los aislamientos PA0, TN503 y TN106 presentaron mitigación del estrés salino en los tres tratamientos salinos con concentraciones de 50, 100 y 200 mM de NaCl. La evaluación del efecto post-inoculación con aislamientos prometedores en promoción de crecimiento vegetal y mitigación al estrés causado por la salinidad en suelos constituye un factor clave y aprovechable desde el punto de vista biológico y económico, es importante identificar los posibles mecanismos de acción, como la regulación de fitohormonas, producción de antioxidantes, degradación de etileno

que permiten a PA0 y los aislamientos TN503 y TN106 mitigar el estrés salino ya que con respecto a los otros aislamientos mostraron un efecto superior.

7. CONCLUSIONES

Las rizobacterias promovieron el crecimiento en tomate. De 35 rizobacterias evaluadas en plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero, cuatro (TN106, TN333, TN503, TN26) incrementaron el peso seco de vástago y raíz respecto al control negativo.

Las rizobacterias mitigaron el estrés salino en plántulas de tomate a 50, 100 y 200 mM de NaCl. El aislamiento TN503 presentó mayor tolerancia al estrés salino en concentraciones de 100 mM NaCl 68,9%. La cepa TN26 mejoró la tolerancia al NaCl a 100mM NaCl (37,5%) con respecto a los controles, la concentración 0mM de NaCl. Mientras que la cepa TN 333 no presentaron tolerancia al NaCl en ninguna de las tres concentraciones de NaCl.

Las rizobacterias presentaron la capacidad de crecer en medios libres de N, solubilizar fosfatos, producir ácido indolacético. La capacidad de fijación de N fue superior en TN26 (22,3ppm) y TN106 (27,6 ppm), superando la producción de los controles PA0 y *Azospirillum*. La solubilización de fosfatos no se observaron valores mayores a los controles positivos. Los cuatro aislamientos presentaron una actividad solubilizadora de fosfatos similar entre ellos. Todos los aislamientos fueron productores de ácido indolacético con valores inferiores a los de los controles positivos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Escalona V, Alvarado P, Monardes H, Urbina C MA. MANUAL DE CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Internet]. 2009. Available from: http://www.cepoc.uchile.cl/pdf/Manua_Cultivo_tomate.pdf
2. Cámara de comercio de Bogotá. Manual tomate. 2015.
3. DANE. ENCUESTA NACIONAL AGROPECUARIA ENA [Internet]. 2015. Available from: http://dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2015/boletin_ena_2015.pdf
4. Moreno-Sarmiento, N., Moreno-Rodríguez, L., & Uribe-Vélez D. Biofertilizantes para la Agricultura en Colombia. 2006.
5. Banerjee M, Yesmin L VJ. Handbook of Microbial Biofertilizers [Internet]. 1st ed. M. K. Rai P, editor. New York: IBDC; 2006. Available from: [https://www.k-state.edu/fungi/Greeting/Publications_files/2006 Handbook.pdf](https://www.k-state.edu/fungi/Greeting/Publications_files/2006%20Handbook.pdf)
6. Agricultura. O de las NU para la A y la. MANUAL TÉCNICO BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS –BPAEN LA PRODUCCIÓN DE TOMATE BAJO CONDICIONES PROTEGIDAS.2007
7. Singh J, Pandey V SD. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. Agric Ecosyst Environ [Internet]. 2011;140:339–53. Available from: https://www.academia.edu/5595472/Efficient_soil_microorganisms_A_new_dimension_for_sustainable_agriculture_and_environmental_development
8. Alexis Lamz Piedra, C. María CGC. La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. Cultiv Trop [Internet]. 2013;34. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362013000400005
9. Kloepper JW. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Encyclopedia of

Genetics. 1st ed. Press A, editor. New York; 2001.

10. Lucy M, Reed E RGB. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek [Internet]. 2004;86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103234>
11. Paul D, Lade. H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. Agron Sustain Dev. 2014;34(4):735–52.
12. IDEAM. Colombia y la erosión de su territorio. 2017; Available from: <https://www.tiempo.com/ram/329692/colombia-la-erosion-territorio/>
13. Ghyselinck J, Velivelli SLS, Heylen K, O'Herlihy E, Franco J, Rojas M, et al. Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: Screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. Syst Appl Microbiol [Internet]. 2013 Mar;36(2):116–27. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202012001622>
14. Anwar S, Ali B, Sajid I. Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. Front Microbiol [Internet]. 2016 Aug 29;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01334/abstract>
15. S. Islam, A. Akanda, A. Prova, T. Islam MH. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. Front Microbiol [Internet]. 2015;6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735380/>
16. Karlidag H, Yildirim E, Turan M, Pehlivan M, Donmez F. Plant Growth-promoting Rhizobacteria Mitigate Deleterious Effects of Salt Stress on Strawberry Plants (*Fragaria Xananassa*). HORTSCIENCE. 2013;48(563–567).
17. Sanchez D, Bonilla R. RESPUESTA VEGETAL DE *Acacia decurrens* A LA INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL BAJO ESTRÉS SALINO. TEMAS Agrar. 2014;19(2):159–72.
18. Habib SH, Kausar H, Saud HM. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. Biomed Res

- Int [Internet]. 2016;2016:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/6284547/>
19. Bharti N, Pandey SS, Barnawal D, Patel VK, Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 6;6(1):34768. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep34768>
 20. Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2004 Jun;42(6):565–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942804000762>
 21. Dell'Amico JM, Parra M. EFECTO DEL ESTRÉS POR NaCl EN EL CONTENIDODE CLORUROS, EL POTENCIAL OSMÓTICO REALY EL CRECIMIENTO DE DOS CULTIVARES DE TOMATECUBANOS. *Cultiv Trop* [Internet]. 2005;26(2):39–44. Available from: <http://www.redalyc.org/html/1932/193215934007/>
 22. Morales, Dell'Amico, Rodríguez, Torrecillas S-B. EFECTO DEL ESTRÉS POR NaCl EN EL CRECIMIENTO Y LAS RELACIONES HÍDRICAS EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) DURANTE EL PERÍODO VEGETATIVO. *cultrop*. 2010;31.
 23. Ali S, Charles TC, Glick BR. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2014 Jul;80:160–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814001375>
 24. FAO. EL CULTIVO DE TOMATE CON BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LA AGRICULTURA URBANA Y PERIURBANA. 2013.
 25. Naika S, Lidt de Jeude J, de Goffau M, Hilmi M van DB. Cultivation of tomato. [Internet]. 4th ed. Dam B van, editor. 2005. Available from: https://publications.cta.int/media/publications/downloads/1296_PDF_1.pdf
 26. Ganaderia M de A y. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. San José, Costa Rica; 1991.
 27. Lozano UJT. Manual de Producción de Tomate Bajo Invernadero [Internet]. Bogotá;

2009. Available from:
http://www.utadeo.edu.co/files/node/publication/field_attached_file/pdf-manual_produccion_de_tomate_-_pag._web-11-15.pdf
28. Curtis H, Barnes N, Schnek A, Flores G, Gandola L KR et al. *Biologia*. Bologna. Zanichelli. 2003;
 29. Rives N, Acebo Y HA. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba*. UM Redalyc [Internet]. 2007;28. Available from: <http://www.redalyc.org/html/1932/193217731004/>
 30. J. K. Host specificity in microbe-microbe interactions. 1994;
 31. Cano M. A REVIEW OF INTERACTION OF BENEFICIAL MICROORGANISMS IN PLANTS: Mycorrhizae, *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. *Rev UDCA Act Div Cient*. 2011;14.
 32. Egamberdieva, Dilfuza, Shrivastava, Smriti, Varma A, editor. *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. Soil Biology Free Preview; 2015.
 33. Puente M, García J PA. *Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz*. Buenos Aires: instituto nacional de tecnología agropecuaria.2013
 34. Beneduzi A. Ambrosini A PL. No Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2012;35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571425/>
 35. Camelo R. M, Vera M. S BBR. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu* [Internet]. 2011;12. Available from: <http://www.redalyc.org/html/4499/449945031010/>
 36. Tien TM, Gaskin MH, Hubbel DH. Plant growth substances produced by *A. brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol*. 1979;37:1016–24.
 37. REVISIÓN. BPDCVACGU. Loredó Osti C, López Reyes L, Espinosa Victoria D. *Terra Latinoam* [Internet]. 2004;22. Available from:

<http://www.redalyc.org/pdf/573/57322211.pdf>

38. Azcón-Bieto J TM. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona Publicacions i Edicions la Univ Barcelona. 2009;
39. PARICIO-TEJO P.M. CA-I& MB. Fijación de Nitrógeno molecular. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal McGraw-Hill-Interamericana. Madrid; 2008. p. 305–22.
40. S. C. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Review. Univ Salamanca [Internet]. 2011; Available from: <http://biossa.org.mx/AIA.pdf>
41. Varma A. Soil Biology. India: Amity Institute of Microbial Technology, Amity University Uttar Pradesh,; 2007.
42. Patiño Torres C SDPM. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes kunth*). Biotecnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial [Internet]. 2012;10. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n2/v10n2a21.pdf>
43. Press C, Loper J KJ. Role of Iron in Rhizobacteria-Mediated Induced Systemic Resistance of Cucumber. Phytopathology. 2001;91.
44. Castagno L, Estrella M, Sannazzaro A, Grassano A RO. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). J Appl Microbiol. 2011;110.
45. Lugtenberg B KF. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu Rev Microbiol. 2009;63.
46. Vyas P GA. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. BMC Microbiol. 2009;9.
47. Ahemad M KM. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. J King Saud Univ - Sci. 2014;26.
48. Ahemad M KM. Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting

Pseudomonas strain. Saudi J Biol Sci. 2012;19.

49. Criollo P, Obando M, Sánchez M. L BR. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu [Internet]. 2013;13. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v13n2/v13n2a09.pdf>
50. Aguilera Gómez L, Olalde Portugal V, Rubí Arriaga M CAR. Micorrizas arbusculares. Cienc Ergo Sum. 2007;14.
51. Andrade M. Ácido Indol Acético (AIA) [Internet]. biosa. Available from: <http://biosa.org.mx/AIA.pdf>. 2005
52. Melgarejo. L, Romero. M, Hernández. S, Barrera. J, Solarte. M SD et al. Experimentos en Fisiología Vegetal. 1st ed. Melgarejo LM, editor. Bogotá; 2010.
53. A. Guzman, M. Obando, D. Rivera RB. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón. Rev Colomb Biotecnol. 2012;14.
54. YOAV BASHAN. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. Biotechnol Adv [Internet]. 1998;16:1–42. Available from: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/inoculants.pdf>
55. Martínez LL, Peniche RAM, Montserrat Hernández Iturriaga, Aguilar, Medrano SMA, Pacheco JR. CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS AISLADAS DE TOMATE Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE TOMATE Y PIMIENTO. Rev Fitotec Mex. 2013;36(1):63–9.
56. Cabra Cendales T, Rodríguez González CA, Villota Cuásquer CP, Tapasco Alzate OA, Hernández Rodríguez A. Bacillus effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L). Acta Biológica Colomb [Internet]. 2017 Jan 1;22(1):37. Available from: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/57375>
57. Martínez LL, Peniche RAMI, Hernández M, Pacheco A, Sofía M. Arvizu Medrano, R. J. CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS AISLADAS DE TOMATE Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE TOMATE Y PIMIENTO. Rev Fitotec Mex

- [Internet]. 2013;36(1):63–9. Available from: <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-1/7a.pdf>
58. Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M, Vanderleyden J. *Azospirillum brasilense* Produces the Auxin-Like Phenylacetic Acid by Using the Key Enzyme for Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005 Apr 1;71(4):1803–10. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.4.1803-1810.2005>
 59. K. Kanimozhi, Panneerselvam A. Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. isolated from Thanjavur district. *Der Chem Sin*. 2003;1(3):138–45.
 60. R Ramjegathesh SV. Bio Control Potential of *Pseudomonas fluorescens* against Coleus Root Rot Disease. *J Plant Pathol Microbiol* [Internet]. 2014;5(1). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/bio-control-potential-of-pseudomonas-fluorescens-against-coleus-root-rot-disease-2157-7471.1000216.php?aid=22724>
 61. M. Begum, V.R. Rai SL. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed borne fungal pathogens in okra. *Phytopathol indio*. 2003;56.
 62. C. Patten BG. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68.
 63. Yasmin S, Rahman Bakar MA, Malik KA, Hafeez FY. Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils. *J Basic Microbiol* [Internet]. 2004 Jun;44(3):241–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.200310344>
 64. Sariah O, L. C. Ng M. S, Radziah O, Abidin MAZ. Rice seed bacterization for promoting germination and seedling growth under aerobic cultivation system. *Aust J Crop Sci*. 2012;6.
 65. Zahid M, Abbasi MK, Hameed S, Rahim N. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Mar 17;6. Available from: <http://www.frontiersin.org/Plant->

Microbe_Interaction/10.3389/fmicb.2015.00207/abstract

66. Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J Exp Bot* [Internet]. 2011 Feb;62(4):1399–409. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erq410>
67. Carrillo A, Li C, Bashan Y. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* [Internet]. 2002 Sep 1;89(9):428–32. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-002-0347-6>
68. Leon Mendoza L. Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Sci Agropecu*. 2014;5(4):177–85.
69. Nehara V, Saharan BS. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci Med Res*. 2011;21.
70. Marques APGC, Pires C, Moreira H, Rangel AOSS, Castro PML. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2010 Aug;42(8):1229–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003807171000146X>
71. DIMKPA C, WEINAND T, ASCH F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* [Internet]. 2009 Dec;32(12):1682–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>

ANEXOS

ANEXO 1: ficha técnica semillas de tomate rio grande

	Reino: <i>Plantae</i> Clase: <i>angiospermae</i> Orden: <i>tubiflorae</i> Familia: <i>Lycopersicum</i> Subclase: <i>dicotyledoneae</i> Género: <i>Lycopersicum</i> Especie: <i>Lycopersicum esculentum</i>	
Planta: Puede desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas). Sistema radicular: raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. Seccionando transversalmente la raíz principal y de fuera hacia dentro encontramos: epidermis, donde se ubican los pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes, córtex y cilindro central, donde se sitúa el xilema (conjunto de vasos especializados en el transporte de los nutrientes). Tallo principal: eje con un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando hojas, tallos secundarios (ramificación simpoidal) e inflorescencias. Su estructura, de fuera hacia dentro, consta de: epidermis, de la que parten hacia el exterior los pelos glandulares, corteza o córtex, cuyas células más externas son fotosintéticas y las más internas son colenquimáticas, cilindro vascular y tejido medular. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales.		
Advertencia: El contenido del sobre, no es apto para el consumo humano o animal. La semilla es tratada con veneno, productos químicos y/o biológicos.		
Recomendaciones: * Proteja los germinadores con mallas evitando el ataque de aves, insectos y roedores. * Haga su cultivo en climas recomendados para cada especie. * Una vez abierto el empaque, utilice la totalidad de las semillas.		
Descripción del Producto: Ciclo de vida total: 30-45 días después del trasplante Tipo de siembra: Directa -Trasplante Germinación: 75% Control de malezas: Manual Tipo de planta: Buena adaptación Color: Verde Sistema de cultivo: Invernadero - Libre exposición Clima: Medio/cálido Peso neto: Sobre x 2.00 g.		
PROCEDIMIENTOS DE MANEJO: * Prepare el germinador, desinfecte y déjelo bien suelto y libre de elementos extraños (insectos, patógenos y maleza). * Sembrar en forma regular y espaciada. Cubrir la semilla con una delgada capa de tierra fina y luego aplanar la superficie suavemente. * Regar permanentemente en forma de lluvia fina con el fin de mantener siempre húmedo el suelo. * Si la especie cultivada es de trasplante hágalo cuando las plántulas tengan una altura de 4 a 6 cm de alto y tengan entre 4 y 6 hojas. * Al trasplantar mantenga una distancia de 0.8 a 1.5 mt entre surcos y de 20 a 40 cm sobre surcos.		
Calle 34 No. 19-38 PBX: (57) 1 285 1029 – 285 1175 -2851946 FAX: (091) 245 5216 Corabastos: Bodega 41 Local – 14 Tel: (091) 740 1283 E-mail: ventas@semicol.co – Pág. Web: www.semicol.co Bogotá D. C., Colombia, Suramérica.		

ANEXO 2: descripción macroscópica y microscópica de rizobacterias gramnegativos TN 106, TN 26, TN 503, TN 333, PA0, AZP.

MORFOTIPO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS
TN 106	FORMA: Puntiforme BORDE: Entero ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa CONSISTENCIA: Cremosa COLOR: Blanco
TN 26	FORMA: Irregular BORDE: Ondulado ELEVACIÓN: Plana SUPERFICIE: Lisa CONSISTENCIA: Viscosa COLOR: Blanco
TN 503	FORMA: Puntiforme BORDE: Entero ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa CONSISTENCIA: Cremosa COLOR: Blanco
TN 333	FORMA: Circular BORDE: Entero ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa CONSISTENCIA: Cremosa COLOR: Blanco
PA0	FORMA: Circular BORDE: Entero ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa CONSISTENCIA: Cremosa COLOR: Blanco con pigmentación verde
AZP	FORMA: Circular BORDE: Entero ELEVACIÓN: Convexa SUPERFICIE: Lisa CONSISTENCIA: Cremosa COLOR: Rojo

ANEXO 3: protocolo ajuste del inóculo

Una vez crecido el microorganismo en caldo se debe ajustar el inóculo. Centrifugue el tubo con los 5.0 ml a 7.500 rpm durante 5 min. Retire el sobrenadante y el pellet re suspéndalo en igual volumen de Agua Destilada Estéril (ADE) para inocular semillas vegetales de interés. El inóculo se debe ajustar en un espectrofotómetro a 0.2 Abs a una longitud de onda de 600nm usando como blanco ADE. Una vez distribuidos los 5.0 ml de inóculo en cinco tubos Eppendorf con 1.0 ml de ADE. Tomar uno de estos tubos para realizar el primer ajuste. Ante el espectrofotómetro coloque los mililitros de ADE necesarios para ajustar a 0.2 absorbancias.

Adicione al primer tubo el mismo volumen y verifique que sea igual a 0.2 Abs. Si este valor no corresponde, ajuste con ADE hasta obtener la absorbancia deseada. Para el tercer tubo ajuste el volumen con ADE y verifique en el espectro. El valor de absorbancia debe ser el deseado.

A los otros tubos añadir la misma cantidad de ADE, pero esta vez en condiciones asépticas bajo cabina. De este modo se tendrían todas las muestras a 0.2 absorbancias a una longitud de onda de 600 nm.

ANEXO 4: solubilizacion de fósforo

PRUEBA CUALITATIVA EN MEDIO SRS

Utilizado para la valoración de la eficiencia relativa de solubilización de los aislamientos, empleando el método propuesto por Sundara Rao y Sinha (1963) sobre el medio SRS, basado en la medición del diámetro de halos de transparencia alrededor de colonias bacterianas que crecen en un medio de cultivo sin formas solubles de PO_4^{3-} pero con fosfato de calcio o hierro, el cual puede ser solubilizado por bacterias que presenten esta capacidad. La eficiencia relativa de solubilización de fosfatos se expresa haciendo una relación del diámetro del halo de solubilización con respecto al diámetro de la colonia.

Para cuantificación y aislamiento de colonias solubilizadoras de fosfatos.

Componentes g/L:

Componentes	g/L
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,5
KCl	0,2
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,002
NaCl	0,2
Glucosa	10,0
Extracto de levadura	0,5
Purpura de Bromocresol	0,1
$\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$	5,0
Agar	18,0

*El fosfato tricálcico se esteriliza aparte y luego antes de dispensar se añade en cabina de flujo al medio.

* El resto de componentes se pesan y disuelven; pero antes de esterilizar se ajusta el pH (7-7.2), si es necesario con una solución de (Na OH) 0.1N.

ANEXO 5: composición del medio NFb, libre de nitrógeno

Fuente combinada de carbono, para aislamiento de diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno

Componentes	g/L
Ácido Málico	5
KOH	4
K ₂ HPO ₄	0,5
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,01
CaCl ₂	0,01
NaCl	0,02
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0,05
Na MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,002
Mn SO ₄ . H ₂ O	0,01
Azul de Bromo tímolo	0,1
Agar	15,0

Los componentes se pesan y se agregan uno a uno a un Erlenmeyer que ya tenga la mitad del volumen de agua total, es importante que todo el tiempo este el medio en la plancha y con agitación magnética, el agar se agrega después de medir el pH. Y luego se esteriliza.

*Al salir el medio de la autoclave agitar en la plancha, revisar que no esté precipitado y servir.

*sembrar en las cajas de Petri por estría pequeña en el medio de la caja.

ANEXO 6: protocolo de lavado y desinfección de semillas

1. En una toalla absorbente poner el número aproximado de semillas a utilizar.
2. Hacer un nudo en la toalla absorbente con el contenido de las semillas, con el fin de que éstas no se dispersen en el lavado y se pierdan.
3. Realizar tres lavados con agua destilada estéril.
4. Realizar un lavado con alcohol al 30% durante un minuto.
5. Realizar de nuevo tres lavados con agua destilada estéril.

ANEXO 7: protocolo ajuste del inóculo

Una vez crecido el microorganismo en caldo se debe ajustar el inóculo. Centrifugue el tubo con los 5.0 ml a 7.500 rpm durante 5 min. Retire el sobrenadante y el pellet re suspéndalo en igual volumen de Agua Destilada Estéril (ADE) para inocular semillas vegetales de interés.

El inóculo se debe ajustar en un espectrofotómetro a 0.2 Abs a una longitud de onda de 600nm usando como blanco ADE.

Una vez distribuidos los 5.0 ml de inóculo en cinco tubos Eppendorf con 1.0 ml de ADE. Tomar uno de los tubos para realizar el primer ajuste. Ante el espectrofotómetro coloque los mililitros de ADE necesarios para ajustar a 0.2 absorbancias.

Adicione al primer tubo el mismo volumen y verifique que el volumen sea igual a 0.2 Abs. Si este valor no corresponde, ajuste con ADE hasta obtener la absorbancia deseada. Para el tercer tubo ajuste el volumen con ADE y verifique en el espectro. El valor de absorbancia debe ser el deseado.

A los otros tubos añadir la misma cantidad de ADE, pero esta vez en condiciones asépticas bajo cabina. De este modo se tendrían todas las muestras a 0.2 absorbancias a una longitud de onda de 600 nm.

ANEXO 9: solución nutritiva hoagland

FUNDAMENTO

Una solución nutritiva es la base de la alimentación de la planta, debe cubrir en cada momento sus requerimientos nutricionales. La composición está dada por la adición de un conjunto de nutrientes minerales añadidos a un predeterminado volumen de agua suficientes para el desarrollo óptimo del material vegetal. La solución nutritiva debe tener un pH adecuado dependiente del cultivo y debe permitir la buena aireación de las raíces.

Soluciones Stock según la tabla a continuación

- Pesar y preparar las soluciones de la 1 a la 4 por separado.
- Pesar y preparar la solución de micronutrientes (6-10) en un mismo recipiente.
- Para la solución EDTA de Hierro: en un frasco oscuro disolver 26,1g de EDTA en 268mL de 1N KOH (pH 8). Luego adicionar 24,9g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Llevar la solución a 1L. Agitar toda la noche.

No	Componente	Solución Stock	Volumen de solución stock/1L (mL)	Elemento	Concentración final (ppm)
1	1 M KH_2PO_4	136g/L	1	N	210
2	1 M KNO_3	101g/L	5	K	234,59
3	1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	236,15g/L	5	Ca	200,4
4	1 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	246g/L	2	Mg	24,305
				S	64,12
				P	30,973
5	EDTA de hierro		1	Fe	
	Micro elementos				
6	H_3BO_3	2.86g/L	1	B	
7	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1.81g/L		Cl	
8	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.22g/L		Zn	
9	CuSO_4	0.080g/L		Cu	
10	$\text{H}_3\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.020g/L		Mo	
11	Agua para completar 1L		985	Mn	

ANEXO 10: peso seco se plántulas inoculada la semilla en tierra

MORFOTIPO	Vástago(SE (mg))	Raiz (SE (mg))	Total(SE (mg))
TN503	3,08 (0,2)	0,94 (0,09)	3,95 (0,19)
TN81	2,81 (0,1)	1,08 (0,09)	3,89 (0,13)
TN1035	2,98 (0,08)	0,61 (0,09)	3,59 (0,11)
TN333	2,33 (0,11)	1,09 (0,12)	3,42 (0,21)
TN106	2,36 (0,15)	1,04 (0,14)	3,41 (0,19)
TN65	2,7 (0,13)	0,63 (0,11)	3,33 (0,13)
76D	2,49 (0,09)	0,83 (0,08)	3,32 (0,1)
TN89	2,53 (0,38)	0,53 (0,09)	3,05 (0,45)
TN151	2,43 (0,23)	0,55 (0,06)	2,98 (0,19)
TN62	2,58 (0,12)	0,4 (0,06)	2,98 (0,12)
C47a	2,61 (0,14)	0,34 (0,06)	2,95 (0,13)
76A	1,99 (0,05)	0,96 (0,08)	2,94 (0,1)
C31	2,06 (0,13)	0,8 (0,09)	2,86 (0,15)
TN91	2,24 (0,18)	0,59 (0,07)	2,83 (0,23)
77C	2,07 (0,08)	0,75 (0,08)	2,83 (0,1)
TN14	2,19 (0,12)	0,57 (0,07)	2,76 (0,16)
TN107	2,06 (0,2)	0,64 (0,11)	2,7 (0,2)
76C	1,93 (0,17)	0,73 (0,08)	2,65 (0,16)
TN68	2,12 (0,12)	0,5 (0,09)	2,62 (0,12)
TN1034	2,19 (0,12)	0,4 (0,08)	2,59 (0,17)
PA0	1,95 (0,07)	0,63 (0,07)	2,58 (0,06)
59D	2,02 (0,06)	0,55 (0,05)	2,58 (0,09)
76B	1,89 (0,11)	0,66 (0,07)	2,54 (0,15)
59A	1,94 (0,08)	0,57 (0,07)	2,51 (0,12)
TN67	2,04 (0,07)	0,41 (0,05)	2,45 (0,05)
TN98	1,95 (0,15)	0,45 (0,05)	2,4 (0,1)
59C	1,98 (0,06)	0,4 (0,07)	2,38 (0,13)
59B	1,65 (0,05)	0,65 (0,05)	2,3 (0)
TN152	1,95 (0,1)	0,35 (0,09)	2,3 (0,15)
TN42	1,75 (0,05)	0,45 (0,15)	2,2 (0,2)
77B	1,65 (0,1)	0,53 (0,06)	2,18 (0,12)
TN80	1,6 (0,11)	0,53 (0,09)	2,13 (0,19)
77A	1,6 (0,03) n	0,52 (0,07)	2,12 (0,09)
TN26	1,9 (0,09)	0,2 (0,06)	2,1 (0,11)
77D	1,62 (0,13)	0,42 (0,09)	2,04 (0,15)
Negativo	1,12 (0,12)	0,32 (0,04)	1,44 (0,11)
AZP	0,75 (0,05)	0,6 (0,1)	1,35 (0,15)

(C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum* (ES): Error estándar

ANEXO 11: peso seco de plántulas que se inóculo la semilla en turba

MORFOTIPO	VASTAGO(mg)	± SE (mg)	LSD	RAIZ(mg)	± SE (mg)	LSD
TN26	3,78	± 0,11	Ba	1,38	± 0,09	a
TN503	3,67	± 0,19	Ba	1,23	± 0,07	ba
TN333	3,93	± 0,07	A	0,64	± 0,12	kjihgfe
TN106	3,33	± 0,26	Cb	0,68	± 0,26	kjihgfe
TN1035	2,92	± 0,20	Dc	0,98	± 0,05	cb
59A	2,37	± 0,25	Jihgfe	1,00	± 0,07	cb
76D	2,50	± 0,19	lhgfe	0,86	± 0,09	gfedc
TN81	2,80	± 0,30	Gfedc	0,55	± 0,25	kjihgfe
TN62	2,70	± 0,10	Fed	0,50	± 0,07	kji
TN1034	2,58	± 0,22	Hgfe	0,60	± 0,10	kjihgfe
59C	2,52	± 0,22	lhgfe	0,58	± 0,09	kjihgf
TN152	2,36	± 0,26	Kjihgfe	0,74	± 0,19	jihgfedc
TN98	2,44	± 0,25	lhgfe	0,63	± 0,08	kjihgfe
TN42	2,55	± 0,24	lhgfe	0,48	± 0,09	kji
TN151	2,20	± 0,24	Mlkjih	0,82	± 0,16	hgfedc
C31	2,68	± 0,17	Gfed	0,34	± 0,10	k
AZP	1,97	± 0,03	Onmlkji	0,93	± 0,07	fedcb
PA0	1,93	± 0,14	Onmlkj	0,88	± 0,06	gfedc
TN91	2,28	± 0,12	Lkjihgf	0,45	± 0,14	kji
TN80	1,76	± 0,17	Ponm	0,90	± 0,14	fedc
TN89	2,03	± 0,09	Nmlkji	0,60	± 0,15	kjihgfe
TN65	1,70	± 0,10	ponmXX	0,85	± 0,15	ihgfedc
TN67	1,94	± 0,14	Nmlkj	0,58	± 0,19	kjihgf
TN107	2,10	± 0,18	Nmlkji	0,40	± 0,10	k
76B	1,85	± 0,17	Ponml	0,62	± 0,05	kjihgfe
59B	1,83	± 0,05	Ponm	0,60	± 0,06	kjihg
NEGATIVA	1,50	± 0,12	Po	0,91	± 0,12	ed
TN14	1,90	± 0,15	Ponmlkj	0,48	± 0,09	kji
76C	1,70	± 0,20	Pon	0,52	± 0,09	kjih
77B	1,73	± 0,18	Ponm	0,48	± 0,08	kji
C47A	1,85	± 0,16	Ponmlkj	0,33	± 0,08	k
77D	1,70	± 0,13	Pon	0,40	± 0,07	k
TN68	1,30	± 0,25	P	0,37	± 0,09	kj

(SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum*

ANEXO 12: peso seco plántulas inoculadas sobre la tierra

MORFO TIPO	VASTAGO(mg)	SE	LSD	RAIZ(mg)	SE	LSD	TOTAL	SE	LSD
TN26	4,40	0,26	a	1,37	0,09	Cba	5,77	0,29	a
59A	3,96	0,07	ba	1,44	0,23	Ba	5,40	0,18	ba
TN503	3,95	0,05	ba	1,15	0,25	ihgfedcba	5,10	0,30	cb
TN106	3,60	0,31	cb	1,33	0,09	dcba	4,93	0,35	dcba
TN333	3,88	0,11	b	1,03	0,21	ihgfedc	4,91	0,16	c
TN62	3,50	0,50	cb	1,00	0,10	lkjihgfedcba	4,50	0,60	edc
59C	2,90	0,06	fed	1,47	0,11	A	4,37	0,10	e
76D	3,87	0,09	ba	0,50	0,12	nml	4,37	0,12	fed
TN1035	3,22	0,12	dc	0,96	0,05	lkjihgfedc	4,18	0,10	fe
TN80	2,89	0,10	fed	1,19	0,14	edcba	4,07	0,13	gfe
77A	2,70	0,10	gfed	1,30	0,30	fedcba	4,00	0,40	hgfe
C31	2,88	0,17	fed	1,00	0,16	kjihgfedc	3,88	0,23	hgfe
TN14	3,17	0,69	edc	0,53	0,15	nmlk	3,70	0,55	ihgf
TN1034	2,55	0,19	gf	1,03	0,08	jihgfedcb	3,58	0,18	jihg
TN98	2,92	0,09	fed	0,52	0,14	MI	3,43	0,13	kjih
76B	2,68	0,06	gfe	0,65	0,06	nmlkji	3,33	0,05	lkjih
TN107	2,43	0,12	hgf	0,80	0,21	nmlkji	3,23	0,19	mlkji
TN81	1,97	0,09	jih	1,20	0,12	gfedcba	3,17	0,03	nmlkji
TN91	2,40	0,10	ihgf	0,65	0,05	nmlkji	3,05	0,15	ponmlkji
TN152	2,40	0,26	hg	0,64	0,12	nmlkji	3,04	0,30	nmlkj
C47a	1,87	0,14	ji	1,09	0,11	gfedcb	2,96	0,18	onmlk
77C	1,90	0,10	lkjih	1,05	0,35	jihgfedcba	2,95	0,45	qponmlkji
AZP	2,00	0,06	jih	0,92	0,17	lkjihgfedc	2,92	0,17	ponmlk
PA0	2,04	0,09	jih	0,82	0,09	nmlkji	2,86	0,09	qponml
TN42	1,95	0,15	kjih	0,90	0,10	nmlkji	2,85	0,05	qponmlkj
TN67	1,80	0,17	lkji	0,70	0,31	nmlkji	2,50	0,47	qponm
TN68	1,42	0,16	mlk	0,96	0,14	lkjihgfedc	2,38	0,19	qp
59B	1,75	0,10	lkj	0,60	0,12	nmlkj	2,35	0,19	qpo
59D	1,60	0,10	mlkj	0,75	0,05	nmlkji	2,35	0,05	rqpon
Negativa	1,48	0,12	lk	0,87	0,13	mlkji	2,35	0,21	q
77B	1,73	0,10	lkj	0,60	0,08	nmlkj	2,33	0,15	qp
76C	1,25	0,05	ml	1,05	0,05	jihgfedcba	2,30	0,00	rqpo
77D	1,80	0,12	lkji	0,50	0,15	nml	2,30	0,21	rqpo
TN89	1,77	0,23	lkj	0,53	0,19	nmlk	2,30	0,30	rqpo
TN65	1,60	0,23	lkj	0,60	0,12	nmlkj	2,20	0,35	rqp
TN151	1,03	0,09	m	0,40	0,06	N	1,43	0,15	r

(SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum*

ANEXO 13: peso seco de plántulas inoculadas sobre turba y tierra en el momento del transplante

CEPA	VÁSTAGO				RAÍCES			
	Media	ES	LSD	%	Media	ES	LSD	%
59D	4,90	0,59	Fedcba	94	1,67	0,15	a	206
TN152	5,27	0,41	Dcba	108	1,40	0,23	ba	157
C47a	4,37	0,69	Fedcb	73	1,40	0,25	ba	157
TN106	6,67	1,97	A	164	1,37	0,12	ba	151
PA0	4,10	0,35	Ifedcb	62	1,30	0,17	cba	138
TN98	3,27	0,73	Ifedc	29	1,23	0,07	dcba	126
TN91	5,27	1,39	Dcba	108	1,20	0,31	edcba	120
TN42	5,10	0,72	Edcba	102	1,17	0,09	fedcba	114
59A	5,23	0,38	Edcba	107	1,10	0,20	ifedcb	102
TN333	4,70	0,64	Fedcba	86	1,10	0,06	ifedcb	102
TN503	5,30	0,10	Edcba	110	1,05	0,35	jifedcb	93
TN62	5,47	1,07	Cba	116	1,03	0,07	jifedcb	89
TN14	3,03	0,50	Ife	20	1,03	0,09	jifedcb	89
TN65	5,57	1,36	Ba	120	1,00	0,20	jifedcb	83
59C	4,50	0,90	Ifedcba	78	1,00	0,40	hjifedcb	83
TN89	4,25	0,15	Ifedcb	68	1,00	0,10	jifedcb	83
TN80	4,07	1,03	Ifedcb	61	1,00	0,06	jifedcb	83
TN1035	3,10	0,70	Ifed	23	1,00	0,45	jifedcb	83
76B	4,00	0,29	ifedcb	58	0,97	0,15	hjifedcb	77
59B	4,70	1,39	fedcba	86	0,93	0,46	hjifedcb	71
77C	2,83	0,15	if	12	0,90	0,15	hjifedcb	65
TN67	4,13	0,29	ifedcb	64	0,87	0,18	hjifedcb	59
TN68	4,10	0,20	ifedcb	62	0,85	0,05	hjifedcb	56
C31	5,57	0,47	ba	120	0,80	0,15	hjifedc	47
TN151	4,20	0,82	ifedcb	66	0,77	0,03	hjifedc	41
TN81	5,40	0,20	edcba	114	0,70	0,10	hjifed	28
76D	5,23	0,98	edcba	107	0,70	0,12	hjifed	28
TN1034	4,40	0,49	Fedcb	74	0,70	0,17	hjifed	28
AZP	4,23	0,66	Ifedcb	68	0,67	0,24	hjife	22
76A	4,63	1,19	Fedcba	83	0,63	0,32	hjife	16
77D	3,97	0,67	Ifedcb	57	0,60	0,21	hji	10
TN26	3,05	0,45	Ifed	21	0,55	0,05	hji	1
C-	2,53	0,31	I	0	0,55	0,07	h	0
77A	4,23	0,35	Ifedcb	68	0,53	0,09	h	-2

(%): incremento porcentual relativo con respecto al control negativo, (SE): Error estándar, (LSD): Comparación de medias por la prueba de diferencias mínimas significativas, (C-): Control negativo, plantas sin inocular (PA0): *P. aeruginosa*, (AZP): *Azospirillum lipoferum*

ANEXO 14: identificación de las cepas bacterianas seleccionadas (TN503, TN106, TN26 y TN333)

TN50/*Pseudomonas chlororaphis* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DR2

ACGCACAGATTTGACTTGTCTAGTAGATACGTTGACCGTAATTAGCGCGTTTCT
GTGAATCTCAATTCTCAATCTTTCCGAAGCCGAGAGGAGGTGAGGGTTGGGT
TCGTAGGTCAGATCTGCCCCGAATTCATCAGTTGATTCTGCTAGATAAGCAAA
GAAAGAAAGGCATCTAGTCTTAAAGTACTGTTGCCAGCCAGGCCAGCAGGT
AGATGACGGGAGGGGTGCCATGCTTTGAATCGGAAATTAGCTGGAGCAGTAA
AGCGCCCGGCAGGCGGTTTGTCTAAGTCAAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAA
CGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGTA
GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTG
GCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTT
GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCATCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGA
ACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACATAATG
GTGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGG
CGTATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACG
TCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTACACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTT
CGGGAGGGGCGCTACTACTTTTTGATGCTTGCTGCTGCAGCATACACATGCAG
TCGAGCGGTAGCACAAGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGG
GTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACG
GTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCT
CACGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCT
CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTGGTGTGTTAATAGCGCAT
CACATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
ACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAA
CTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG
GCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTG

TGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTTAGTCGACCGCCTGGG
 GAGTACGGCCCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTTGACGGGGGGCCCCGCACA
 AGCGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGATGCAACGACGAAGAACCCTTACCCT
 ACTCCATGACATTCCAGAGGAATTCGGCTAGAGATTAGGCTCAGTGCCTTCC
 GGGAACCTCTGAGACAGATGCTGGCATTGACAGTTCAGTCAAGCTCACTCTC
 GTGCATTAGTGTATGACTTAGGTTACAGCCACCGTAGCAGCAGACTTCAGTAC
 CCTATGTCTGCTGCAGCATAACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAAGAGAGCT
 TGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGC
 CTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCT
 TCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCCAAG
 TGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC
 TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
 GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGA
 GGAGGAAGGGTGGTGTGTTAATAGCGCATCACATTGACGTTACTCGCAGAAG
 AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCA
 GATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCT
 AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG
 CTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCTGTAAACGATGTCGACTTGAGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG
 AGCTAACGCGTTTAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAAC
 TCAAATGAATTTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGGTTTAATT
 CGATGCAACGACGAAGAACCCTTACCCTACTCCATGACATTCCAGAGGAATTC
 GGCTAGAGATTAGGCTCAGTGCCTTCCGGGAACCTCTGAGACAGATGCTGGC
 ATTGACAGTTCAGTCAAGCTCACTCTCGTGCATTAGTGTATGACTTAGGTTAC
 AGCCACCGTAGCAGCAGACTTCAGTACCCTATGT

TN26/Citrobacter freundii strain VTW-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGGATCGTGATGTGATATGGAACGCATGGTGCGTCGGAATGTCATGTACTTC
 CAGGCCGAGAGAGGAAGGACGGATTAATGGGTACTAGTCGTAGTCGACTGGT
 ACGTTTACCCAGCAAGAACGCAAGCACTGAGACTTAACTCCGTGCTCAGCAG
 CCTGCTGTAATACGGGAGGGGTGCAATGCGTTAATCGGAAATTAGCTGGGCG
 TAAAGCGCCACGCAGGTCTGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCGCCCCGGGCT
 CAAACGTAGGGAACTGCATTGAAAACCTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGG
 GGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
 CGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
 CGACTTGAGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAG
 TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG

GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTC
 GGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAAT
 GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGT
 TCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
 TCGTCTGATGTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC
 GCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 ACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAA
 CCTTCGGGAGGGCGCTACTACTTTTGATGCTGGCAGCGCAGCTACACATGCA
 GTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACG
 GTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCT
 CTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCT
 CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
 GGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATAAAGTTAATAACCTTG
 TCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
 ACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
 ACTGCATTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAAGAGGGGGGTAGAATTCCA
 GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
 GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTT
 GTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGG
 GGAGTACAGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGTATTGACGGGGCCCGCACAAAG
 CGGCTGGGAGCATGTTGTTTTTACTTCGATGCAACGACGAAGAAGCCTTTACC
 CTACTCTTGATCAATCCAGAGAACTTAGGCAGGAGAATGCATGTCGGTGCTTC
 TGCGAACTCTGTAAACAGCATGCTGGCATTGGCATGATCAGTCAGCTTCGTG
 CTGCTCGCACACTCGGAAAGGGAGATAGTCACGCCAACGAGCGACGAGGCC
 TTATCCAATTAGCCATTGCCGTAGTAT

TN33/Serratia sp. JCM 28288 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

GACATGGACTGGTATGTGTATGTCTGACAGCTATGGCCGTTCCGGAATGCTC
 AATGGCTAATCTTTTCCAGCGAAGGAGGTATGGTTGGTTGTTGTTCACTCT
 AGTCGCAATCATCAGTGATCGGTACCTAGGCAAGAAAGAAAGCCATCTGAG
 TCTAACTTCCGTGCTCAGCAGCCGGCGGTTAATTACGGAGGGGTTGCAAGGC
 GTTTAATTGGAATTACTGGGCAGTAAACGCGCACGCAGGGCGGTTTGTTA

AGTCAAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGG
CAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAA
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT
GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAT
TCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACATAATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCC
GGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAACTCG
CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGG
TTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACTACTTTTGATG
CTGGCACGGCAGCATAACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGC
TCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTG
ATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTTCG
GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGA
GGAAGGGTGGTGTGTTAATAGCGCATCACATTGACGTTACTCGCAGAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGAT
GTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGA
GTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGAT
CTGGACGAATACCAGTGGCGAAGGCTGCCCCCTGGACTACTACTGACGCTCA
AGTGCGAAAGCGTGGGTAGCTAACAGGGAGTTGCATACCCCCGGTAGTCCAT
ATCTCTAAACAATGTGACATTGTACGCTGTGTCCCTTTAGGACGTTCTCTCC
CCGAGCTAAAAGCGTCTAAGTCTACCTGCTTGAGGGAGGATCGTCCGCCTCA
GTTGATCAGCTGAGAATGTACTATGTACGTGAGTGAACCAAACACCGCCGTG
CGAGCAAGCTTTGGACGCATAGGTAGTACCGATGCGACGAATAGTCACTTAA
CTGATATTACGCAGACTGGCATGACTAGGAAGTAGGCTCAGTGACCTGCCTT
GCAGGAATAACTGAAAGTGCGATACTGCAATTGCACTAACCTACGTCGTAGAC
ATAAGTGTCAGGACGAAGGGCAACTGCATTACCA

TN106/*Pseudomonas chlororaphis* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DR2

CATTGCCCTGCGTGATTGACGTATGGCTTAGATGCTCATGTCAATTTGCAGGC
GAGAGTAGGTAGTGTGTTACTAGGCACATGGCATTGTATCGTTACTAGCAGGA
GGACGCACTGGCTTAACTCGTGCAGCAGCCGCAGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGGCGGTTTGTTAAG
TCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAA
GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCT
TCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAG
AGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGC
AAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACTACTTTTGATGCTG
GCTGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTTGCTCT
CTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG
GAGGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGAC
CAAAGTGGGGGACCCTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGAT
TAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGG
AAGGGTAGTGTGTTAATAGCACATTGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTG
AAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTC
TTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAACACTGACGCTCAGG
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGT
AAAAGATGTTCGATTTTGGAGGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTA

ACACGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACTTGCCGCAATGTTTAAAACTCTAA
TTTAATTTGACGGGGGTCCACACAAGCTGTGGTAGCATGTAGCTTTAAATTT
AATGCTAACTCAGAGCATGCATCACCTTACCTTATGACGTCGGCAGGAACGTT
ATCTTGAAAATAGGATGGTGTCTTTTCTTGCAAGTTACCATGACAAGTAGCAGT
GCATGACATGACTACACCATCATGTTCCGGCTATAGATAGAGGTGATCAGACG
AGGGCATGTCTACATTGCTGATGAGTCGACTG

**TN15-2/*Pseudomonas chlororaphis* gene for 16S ribosomal RNA, partial
sequence, strain: DR2**

ACATTGACCGGTTGTTTGGACGATTGGCCTCGAATGTCATGTCACTTCAAGCG
ACGACGAAAGGTTGATGCTGTCAATCAGCGCATCACATTGATCGTTACTAGCA
GACGAGCACTTGGCTTACTCCGTGCAGCCAGCGCGGGTAATACGGAGGGGT
GCAAGCGTTTTAATCGGAAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTTGT
TAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAACTGG
CAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATT
CGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCC
GGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAACTCG
CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGG
TTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACTACTTTTGATG
CTGGCTGGCGGCAGCATACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAGCTT
GCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCC
TGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTT
CGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG
CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAG
GAGGAAGGGTGGTGTGTTAATAGCGCATCACATTGACGTTACTCGCAGAAGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC

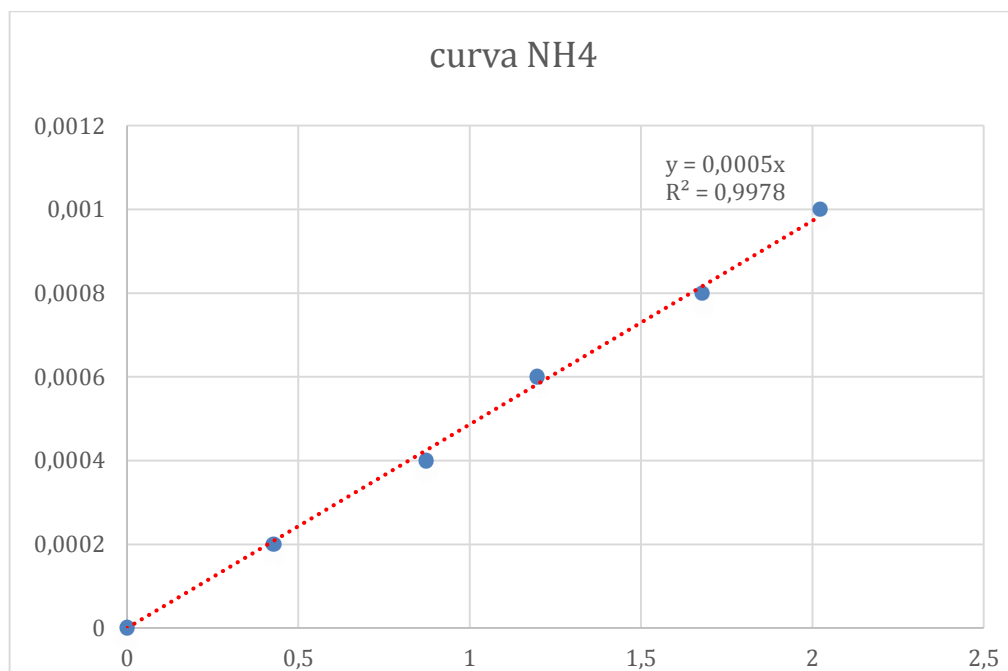
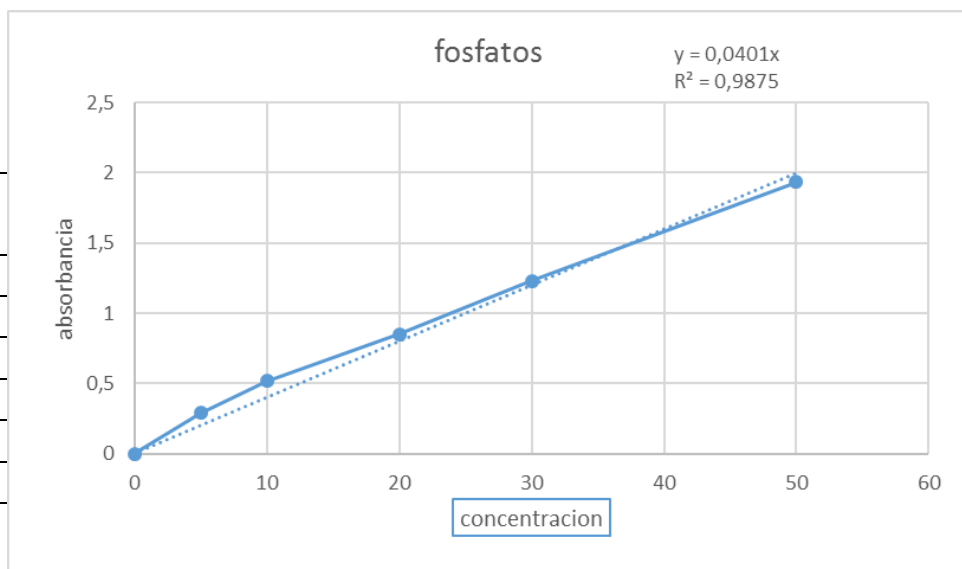
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAG
ATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTA
GAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGA
GCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTC
AAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCTA
TGCAGCGACGAAAGAACCTTCACCCTACTCTTGAACATCCAGCAGAAGTTCTG
CTAGAAGATAGCCTTAGTGCCTTTCCTGTGAACGTCATGAAGACAGATGCCTG
GCATTGGCATGTACATCACCTCGCGCTTTGCTGCAACTGATAGATTAGTTCCA
GCACGGAGCAGCGAAACCTTTACATACCAT

ANEXO 15: curvas de calibración mecanismos de acción SOLUBILIZACION DE FOSFATOS

concentración mg/ml	ABS
0	0
5	0,2915
10	0,5185
20	0,852
30	1,231
50	1,933

FIJACIÓN DE

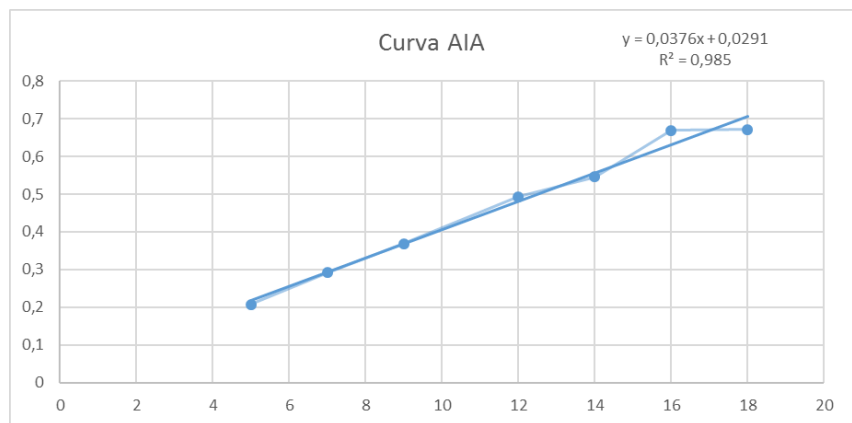
NITRÓGENO



ABS	0	0,428	0,8735	1,1975	1,6795	2,0225
concentración n mg/ml	0	0,0002	0,0004	0,0006	0,0008	0,001

ÁCIDO INCOLACETICO

concentración ug/ml	absorbancia
5	0,207
7	0,292
9	0,369
12	0,493
14	0,546
16	0,669
18	0,672

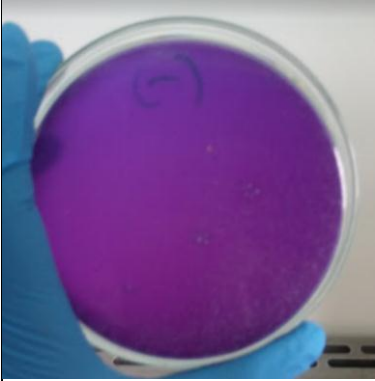
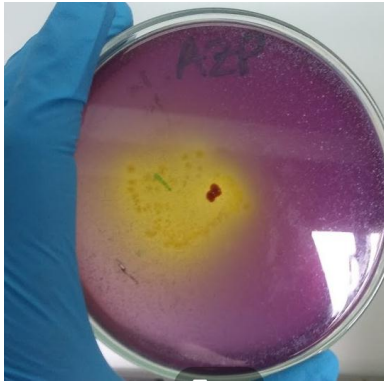
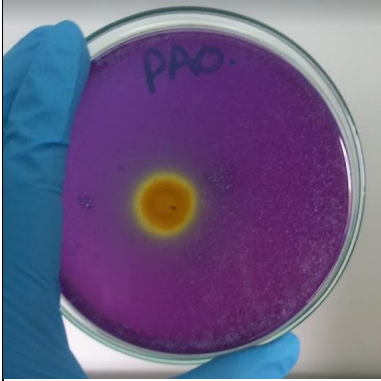
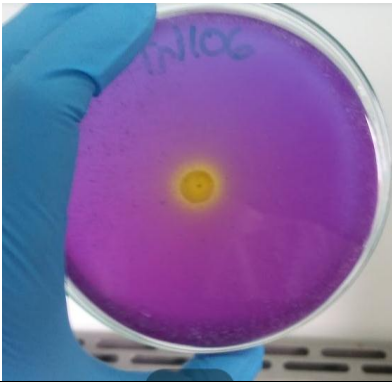
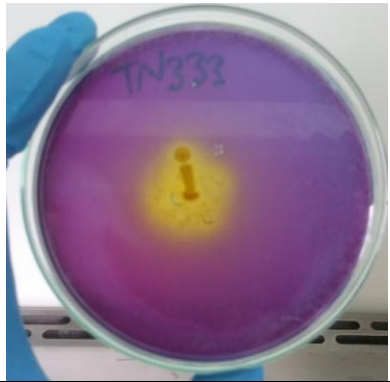
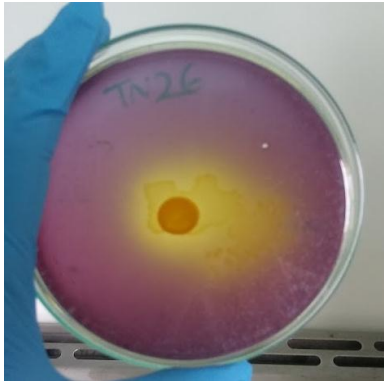


ANEXO 16: crecimiento plántulas de tomate en germinadores

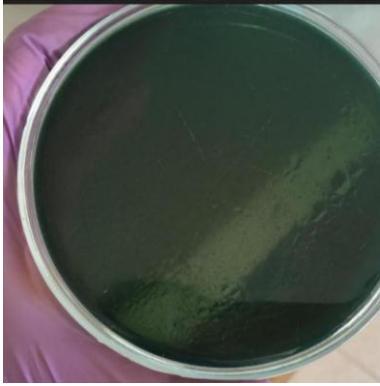
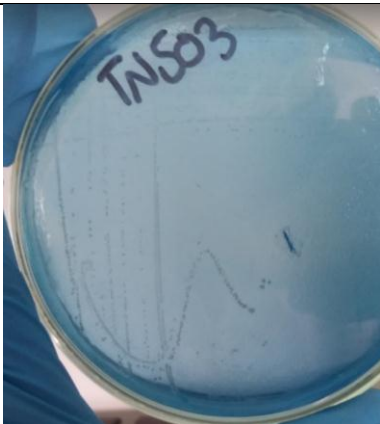
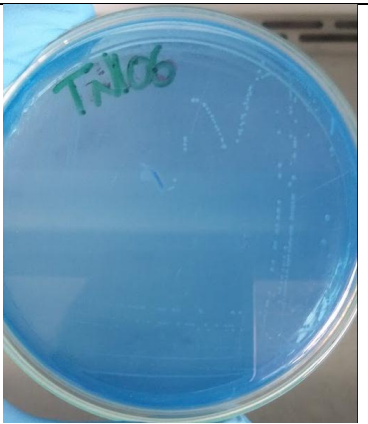
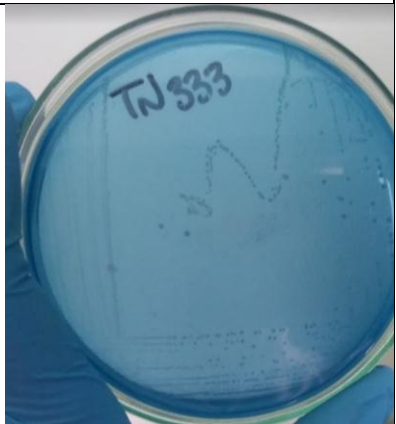


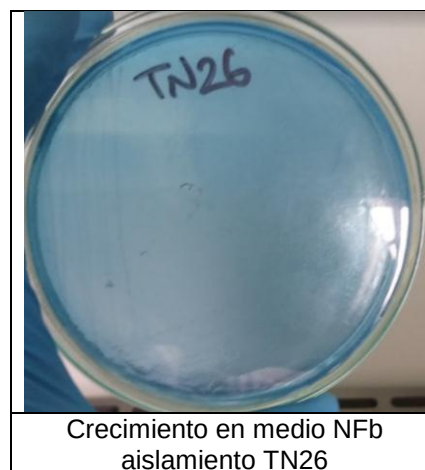
Plántulas de tomate cultivadas en germinados en condiciones de invernadero

ANEXO 17 resultados solubilización de fosfatos en medio SRS

		
Control NEGATIVO medio SRS	Control positivo : AZP (<i>Azospirillum</i> sp.) crecimiento en medio SRS	Control positivo : PAO (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) crecimiento en medio SRS
		
crecimiento en medio SRS del aislamiento TN 503	Crecimiento en medio SRS aislamiento TN106	Crecimiento en medio SRS del aislamiento TN333
		
Crecimiento del aislamiento TN26 en medio SRS		

ANEXO 18 resultados fijación de nitrógeno en medio SRS

		
Control NEGATIVO medio NFb	Control positivo : AZP (<i>Azospirillum</i> sp.) crecimiento en medio NFb	PA0 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) crecimiento en medio NFb
		
crecimiento en medio NFb del aislamiento TN 503	Crecimiento en medio NFb aislamiento TN106	Crecimiento en medio NFb del aislamiento TN333



Crecimiento en medio NFb aislamiento TN26