



PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) POR LEVADURAS PSICRÓFILAS.

Paola Andrea Moreno Fuelantala.

Valeria Andrea Osorio López.

Trabajo de anteproyecto para optar al título de bacteriólogo y laboratorista clínico.

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C. 2019**



PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) POR LEVADURAS PSICRÓFILAS.

Paola Andrea Moreno Fuelantala.

Valeria Andrea Osorio López.

Trabajo de anteproyecto para optar al título de bacteriólogo y laboratorista clínico

Asesora Interna

Jovanna Acero Godoy, Ms

Asesora Externa

Laura Inés Cuervo Soto, Ms, PhD

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá D.C. 2019

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo principalmente a Dios por brindarnos comprensión y sabiduría para hacer esto posible, por guiarnos en nuestros estudios y permitirnos comprender las enseñanzas de nuestros profesores.

A nuestros padres y familiares por ser el motor y la fortaleza para terminar nuestra carrera, gracias por todos sus sacrificios.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro profundo y sincero agradecimiento a las personas que han colaborado en la realización del presente trabajo, especialmente a nuestras asesoras Laura Inés Cuervo Soto, Ms, PhD y Jovanna Acero Godoy, Msc, por la orientación, motivación y apoyo recibido a lo largo del desarrollo de este trabajo.

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

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos los conocimientos en el desarrollo de la carrera, por ser testigos de nuestra formación, brindarnos los conocimientos necesarios para ser profesionales de calidad y por su acompañamiento durante esta etapa de nuestras vidas.

Un agradecimiento especial por el apoyo, amor, trabajo y sacrificio recibidos de nuestras familias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	13
SUMMARY	14
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. Objetivo general	3
I.I. Objetivos específicos	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Promoción de crecimiento vegetal por microorganismos.	4
1.2. Microorganismos psicrófilos	4
1.3. Tolerancia a concentraciones salinas por microorganismos.	6
2. MARCO REFERENCIAL	8
2.1. Generalidades del cultivo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	8
2.2. Descripción morfológica y edafoclimatológicas de <i>Solanum lycopersicum</i>	8
2.2.1. Taxonomía.	8
2.2.2. Morfología.	9
2.2.3. Condiciones edafoclimáticas.	11
2.3. Importancia del tomate a nivel mundial y nacional	11
2.4. Valor nutricional	12
2.5. Enfermedades que afectan al Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	12
2.6. Características generales de las levaduras.	13
2.8. Efecto del estrés salino en los microorganismos.	15
2.9. Mecanismos de acción de microorganismos promotores de crecimiento vegetal	15
2.9.1. Solubilización de fosfatos.	15
2.9.3. Ácido Indolacético	17
3. DISEÑO METODOLÓGICO	18
3.1.1. Objetivo 1.	18
3.1.2. Objetivo 2	20
3.1.3. Objetivo 3	22
4. RESULTADOS	23
4.2. Caracterizar los mecanismos de acción de las levaduras psicrófilas promotoras de crecimiento en plantas de tomate.	29
4.3. Evaluar la tolerancia de las levaduras psicrófilas a diferentes concentraciones salinas.	31
5. DISCUSIÓN	32

6. CONCLUSIONES	34
7. RECOMENDACIONES	35
8. REFERENCIAS	36
ANEXO 1. Protocolo de lavado y desinfección de semillas	43
ANEXO 2. Solución Nutritiva Hoagland	44
ANEXO 3. Siembra de semillas en germinadores.	45
ANEXO 4. Plántulas de Tomate dos semanas después de germinación.	45
ANEXO 5. Plántulas de tomate después de haberlas trasplantado.	46
ANEXO 6. Plantas recolectadas post 30 días de interacción con levaduras.	46
Anexo 7. Curva de calibración AIA	49
Anexo 8. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Control.	50
ANEXO 9. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. <i>Rhodotorula</i> 2.	51
ANEXO 10. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. <i>Rhodotorula</i> 4.	53
ANEXO 11. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Control.	54
ANEXO 12. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. LB3.	54
ANEXO 13. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 7.	55
ANEXO 14. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 8.	56
ANEXO 15. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 9.	57
ANEXO 16. Medio NF (libre de N) semisólido.	58
ANEXO 17. Resultados de la tolerancia al estrés salino de las <i>Rhodotorula</i> spp.	58
ANEXO 18. Resultados de la tolerancia al estrés salino de levaduras blancas.	60
ANEXO 19. Resultados de la tolerancia al estrés salino de <i>Azospirillum</i> spp.	60

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Morfología del tomate.	10
<i>Figura 2.</i> Planta de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> .	20
<i>Figura 3.</i> Peso fresco plantas de tomate inoculadas con <i>Rhodotorula</i> spp.	23
<i>Figura 4.</i> Peso fresco planta de tomate inoculadas con <i>Rhodotorulas</i> spp.	24
<i>Figura 5.</i> Peso seco planta de tomate inoculadas con <i>Rhodotorula</i> spp.	24
<i>Figura 6.</i> Peso seco raíz plantas de tomate inoculadas con <i>Rhodotorula</i> spp.	25
<i>Figura 7.</i> Longitud plantas de tomate inoculadas con <i>Rhodotorula</i> spp.	25
<i>Figura 8.</i> Longitud raíz plantas de tomate inoculadas con <i>Rhodotorula</i> spp.	26
<i>Figura 9.</i> Peso fresco de plantas de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con cepas de <i>Mrakia</i> spp., y LB3	26
<i>Figura 10.</i> Peso fresco de raíz de plantas de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con cepas de <i>Mrakia</i> spp y LB3.	27
<i>Figura 11.</i> Peso seco de vástago y total de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con cepas de <i>Mrakia</i> spp. y LB3.	27
<i>Figura 12.</i> Peso seco de raíz de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con cepas de <i>Mrakia</i> spp y LB3	28
<i>Figura 13.</i> Longitud de las plantas <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con cepas de <i>Mrakia</i> spp y LB3.	28
<i>Figura 14.</i> Longitud de la raíz de <i>Solanum lycopersicum</i> inoculadas con cepas de <i>Mrakia</i> spp y LB3	29

TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> .	9
Tabla 2. Cantidad de toneladas de tomate producidas en los cinco departamentos más productores en Colombia.	12
Tabla 3. Principales enfermedades bacterianas y fúngicas que afectan al tomate.	12
Tabla 4. Resultados pruebas de metabolitos en levaduras psicrófilas.	30

ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo de lavado y desinfección de semillas	46
ANEXO 2: Solución Nutritiva Hoagland	47
ANEXO 3: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Control.	48
ANEXO 4: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. <i>Rhodotorula</i> 2.	49
ANEXO 5: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. <i>Rhodotorula</i> 4.	50
ANEXO 6: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Control.	51
ANEXO 7: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. <i>Rhodotorula</i> 3.	52
ANEXO 8: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 7.	53
ANEXO 9: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 8.	54
ANEXO 10: Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 9.	55
ANEXO 11: Medio NF (libre de N) semisólido.	56
ANEXO 12. Lavado de semillas.	56
ANEXO 13. Siembra de semillas en germinadores.	57
ANEXO 14. Plántulas de Tomate dos semanas después de germinación.	57
ANEXO 15. Plántulas de tomate después de haberlas trasplantado.	58
ANEXO 16. Plantas recolectadas post 30 días de interacción planta-inóculo.	58
ANEXO 17. Resultados de la tolerancia al estrés salino de las <i>Rhodotorula</i> spp.	60
ANEXO 18. Resultados de la tolerancia al estrés salino de levaduras blancas.	62

RESUMEN

En los últimos años se han usado métodos químicos como es el uso de plaguicidas y fertilizantes, que producen baja calidad de las plantas y del suelo, influyendo negativamente en la asimilación de nutrientes, disminuyendo la actividad microbiana en el suelo y su interacción con las plantas. Este trabajo pretende evaluar alternativas biológicas para promover el crecimiento de plantas de interés agrícola y tiene el objetivo de evaluar la capacidad de las levaduras psicrófilas para promover el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), analizar los metabolitos que poseen y determinar aquellas que son capaces de tolerar diferentes concentraciones de sal. Los ensayos fueron realizados con 6 cepas de levaduras psicrófilas que fueron aisladas del volcán Xinentécatl (nevado de Toluca), a partir de rizósfera de una planta nativa que se encontraba creciendo en sustrato arcilloso, las cuales fueron inoculadas en las plantas de tomate con el fin de determinar cuáles de ellas promueven mejor el crecimiento, en donde se evidenció que de las 6 levaduras estudiadas las dos mejores promotoras de crecimiento fueron la *Rhodotorula* 4 y una Levadura blanca 3 (muestra sin identificar), teniendo en cuenta que ninguna de las 6 fue significativamente con respecto al control. Adicional se analizaron aquellos metabolitos que podrían promover estos microorganismos por métodos cuantitativos de espectrofotometría, en donde se encontró que la *Rhodotorula* 4 y Levadura 7 (*Makria spp*) son solubilizadoras de fosfatos, bajas productoras de AIA y Amonio, además no son fijadoras de Nitrógeno. Finalmente se encontró que las *Rhodotorula* 2 y *Rhodotorula* 4 soportan hasta una concentración de sal de 50Mm y las levaduras blancas toleran concentraciones de sal altas, sin embargo, su crecimiento pasa de ser abundante a moderado a partir de 100 Mm.

Palabras claves: Psicrófilo, fósforo, Ácido indolacético, sal, nitrógeno, amonio, levaduras, promoción.

Autores: Paola Andrea Moreno Fuelantala, Valeria Andrea Osorio López.

Asesores: Laura Inés Cuervo Soto, Jovanna Acero Godo

SUMMARY

In recent years, chemical methods such as the use of pesticides and fertilizers have been used, which produce low quality of plants and soil, negatively influencing the assimilation of nutrients, reducing microbial activity in the soil and its interaction with plants. . This work aims to evaluate biological alternatives to promote the growth of plants of agricultural interest and has the objective of evaluating the ability of psychrophilic yeasts to promote the growth of tomato plants (*Solanum lycopersicum*), analyze the metabolites they possess and determine those that are able to tolerate different salt concentrations. The trials were carried out with 6 strains of psychrophilic yeasts that were isolated from the Xinentécatl volcano (snowy Toluca), from the rhizosphere of a native plant that was growing in clay substrate, which were inoculated in tomato plants in order to determine which of them best promote growth, where it was shown that of the 6 yeasts studied, the two best growth promoters were *Rhodotorula* 4 and a white Yeast 3 (unidentified sample), taking into account that none of the 6 was significantly with respect to control. Additionally, those metabolites that could promote these microorganisms were analyzed by quantitative spectrophotometry methods, where it was found that *Rhodotorula* 4 and Yeast 7 (*Makria* spp) are phosphate solubilizers, low producers of AIA and Ammonium, and are not nitrogen fixers. Finally, it was found that *Rhodotorula* 2 and *Rhodotorula* 4 support up to a salt concentration of 50Mm and white yeasts tolerate high salt concentrations, however, their growth goes from being abundant to moderate from 100 Mm.

Authors: Paola Andrea Moreno Fuelantala, Valeria Andrea Osorio López.

Assessor: Laura Inés Cuervo Soto, Jovanna Acero Godoy.

INTRODUCCIÓN

En Colombia, y a nivel mundial, el tomate es considerado un alimento primordial debido a sus características nutricionales que permite ser usado como ingrediente alimenticio. Según la Organización de Naciones Unidas para la alimentación y agricultura, el mayor productor de tomate en el periodo 2015-2017, fue Asia (107, 231,248 toneladas), seguido de América (25, 907,713 ton), Europa (24, 490,820 ton), África (21, 685,235 ton), y Oceanía (455,262 ton) (1).

A nivel nacional, la producción a 2018 fue de 632.268 toneladas, y el rendimiento promedio 40,69 toneladas por hectárea. Según la base de evaluaciones agrarias del Ministerio de Agricultura, Antioquia es la región con mayor producción con 156.421 toneladas, seguida por Norte de Santander, con 86.017; Boyacá con 72.851; Cundinamarca, con 70.631 y Santander con 65.948 (2).

La producción de tomate, es favorecida por condiciones del suelo, nutrientes, clima y la interacción de los microorganismos del suelo, los cuales estimulan procesos metabólicos en la planta y ayudan a mitigar condiciones adversas para el cultivo. Los fertilizantes químicos son los nutrientes más usados ya que favorecen en poco tiempo el crecimiento y la producción, pero su uso indiscriminado es lo que produce la baja calidad de las plantas y puede producir cambios en el suelo, como la salinidad, disminuyendo su fertilidad. En Colombia el 12,3% (14'041.883 ha) presenta degradación de suelos por salinización. Los departamentos que presentan mayor salinización de suelos son Magdalena y Cauca con 5,97% de salinización muy severa y 0,77% severa, seguido de la región del caribe 3,97% muy severa y 2,63 severa y la región del pacífico con 2,39% de salinización de sus suelos. Los departamentos más afectados son Magdalena, Atlántico, Cesar, Guajira, Sucre, Valle del Cauca y Cauca con porcentajes de salinización que van desde 10 a 30% (3). El uso de compuestos químicos produce tensiones abióticas en los cultivos, que se suman a otras generadas por el impacto del cambio climático, como inundación, sequía, temperatura extrema, entre otras.

Con relación a la salinización de los suelos, se da por diferentes factores como minería inadecuada, actividades agropecuarias excesivas, deforestación etc., generando suelos infértiles y poco productivos. Aunque diferentes microorganismos han adquirido la capacidad de producir osmolitos orgánicos los cuales funcionan como reguladores, para contrarrestar el estrés abiótico de la sal (4), se conoce que la salinidad afecta diferentes procesos en las células y no permiten el adecuado crecimiento de las plantas, ya que interfieren en la absorción de nutrientes e interacción con microorganismos, estrés hídrico, toxicidad específica, debido a los altos niveles de sodio y cloruro que reducen la captación de K^+ , NO^- , PO_4^- (5).

Por otra parte, la producción de tomate puede verse afectada por enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos e insectos, además de cambios antropogénicos y climáticos, los cuales disminuyen el rendimiento en la producción, generando pérdidas a los productores. Debido a lo anterior, diversas investigaciones se han llevado a cabo con el uso de biofertilizantes, los

cuales promueven el crecimiento de las plantas, a través de diferentes mecanismos, tales como la producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas como auxinas; la más común es el ácido-3-indol-acético (AIA) (6-8). Los macronutrientes no pueden ser asimilados fácilmente por las plantas por eso es necesario la intervención de microorganismos que favorecen la toma de los mismos, como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Brevibacillus brevis*, *Chryseobacterium spp.*, *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp* (7-8). Estos microorganismos han mostrado un efecto positivo al mejorar la productividad de los suelos, los rendimientos y calidad de los cultivos y sus productos. Frente al incremento de las tensiones abióticas y bióticas que afectan actualmente los cultivos, debido al cambio climático, la bioprospección de microorganismos extremófilos y sus capacidades en el sector agrícola es de gran interés. Los microorganismos psicrófilos, son conocidos por crecer en temperaturas de -5°C a 25°C, y han desarrollado diferentes mecanismos que les ha permitido adaptarse a estas condiciones extremas de temperatura. Dentro de las bacterias psicrófilas, las especies del género *Pseudomonas* (9) son las más ampliamente aisladas de ambientes como la Antártica, al igual que especies de levaduras del género *Mrakia*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, las cuales pueden vivir en condiciones extremas de frío, incluso pH y escasez de nutrientes entre otros (10).

Estas han llamado la atención de los investigadores, ya que se han aislado como microorganismos endófitos en plantas agrícolas. Los microorganismos endófitos han sido ampliamente estudiados, debido a la capacidad que de resistencia e inhibición de diversos microorganismos fitopatógenos (11). Adicionalmente, se ha encontrado que levaduras endófitas como las *Rhodotorulas* sp. tienen la capacidad de promoción de crecimiento, debido a que producen auxinas que son reguladores de crecimiento en las plantas, a partir de L-Triptófano como precursor de su biosíntesis. El efecto positivo de promover el crecimiento vegetal se ha visto sobre plantas de maíz (12).

Teniendo en cuenta, las capacidades de promoción de crecimiento vegetal de los microorganismos, y la poca información que se tiene sobre efecto de levaduras como biofertilizantes en cultivos agrícolas, es nuestro interés estudiar las capacidades de levaduras psicrófilas para promover el crecimiento en plántulas de tomate, conocer si el efecto positivo sobre tomate, pueda estar relacionado a la producción de metabolitos promotores de crecimiento vegetal, y finalmente tener el conocimiento que nos permita considerar a las levaduras en nuevas formulaciones para uso agrícola, que puedan mitigar diferentes tipos de estrés abiótico en las plantas. Es por ello que en este trabajo se realiza la siguiente pregunta ¿Qué mecanismos poseen las levaduras psicrófilas que puedan promover el crecimiento en plantas de Tomate, y si estas levaduras tienen la capacidad de crecer a diferentes concentraciones salinas?

OBJETIVOS

I. Objetivo general

Evaluar el efecto de levaduras psicrófilas en la promoción de crecimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

I.I. Objetivos específicos

- Establecer el efecto de las levaduras psicrófilas en la promoción de crecimiento en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero.
- Caracterizar mecanismos promotores de crecimiento vegetal como los son ácido indolacético, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de amonio en levaduras psicrófilas promotoras de crecimiento en plantas de tomate.
- Analizar la tolerancia de las levaduras psicrófilas a diferentes concentraciones salinas, para ser usadas como mitigadoras de estrés salino en plantas de tomate.

1. ANTECEDENTES

1.1. Promoción de crecimiento vegetal por microorganismos.

En la actualidad, se conoce una gran variedad de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de diversos tipos de plantas, a través de diferentes mecanismos. La mayoría y más estudiados son especies de bacterias y algunos tipos de hongos, pero poco se conoce sobre el efecto de las levaduras.

Nassar et al. 2005 evaluaron el efecto de la levadura *Williopsis saturnus*, sobre plantas de maíz, en condiciones de invernadero (10). Las plantas inoculadas con la levadura mejoraron notablemente el crecimiento de las plantas de maíz en suelos tratados con L-triptófano, se evidenciaron aumentos significativos ($P < 0.05$) en los niveles de IAA y ácido indol-3-pirúvico (IPYA) en la planta en comparación con las plantas control. Además, se observó un aumento en peso seco de las plantas, incremento de las raíces, lo cual se relaciona con la producción de IAA y IPYA, comparado con las plantas control. En un estudio realizado por Peña y Reyes en 2007, evaluaron 7 cepas de *Rhizobium* sobre plantas de lechuga. Las cepas promovieron el crecimiento de las plantas con aumento en peso seco, produjeron AIA y crecieron en 2% de NaCl (13). Por otra parte, Pei-Feng et al, en 2014 aislaron 12 levaduras a partir de hojas de *Drosera indica* una planta carnívora de alto uso a nivel de industrias herbóreas, con el fin de determinar la producción de AIA por parte de las levaduras. Las 12 levaduras mostraron producción de AIA, en donde *Aureobasidium pullulans* produjo 147.4 $\mu\text{g/mL}$ considerándose la mayor productora de las 12 levaduras y *Sporisorium reilianum* fue la que produjo 32.6 $\mu\text{g/mL}$ lo que llevó a que se considerara la menor productora de AIA con respecto a las levaduras analizadas.(14)

Algunas especies de *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* UCMB5113 fue evaluado sobre *A. thaliana*, por Asari et al. 2017. El efecto positivo sobre la planta parece estar relacionado con un mayor crecimiento de raíces laterales y formación de pelos radiculares, que permiten la absorción de nutrientes y agua por la planta, además, por la producción de citoquinas y AIA. Esto lo evidenciaron analizando la variable de peso fresco, la cual fue dependiente de la concentración, mostrando un aumento en la raíz y vástago de 1,5 y 3 veces su peso inicial, esto con una concentración de 10 μl y 25 μl de *Bacillus* UCMB511(15). Ibort et al. 2017, evaluaron *Bacillus megaterium* y *Enterobacter C7* sobre el crecimiento de tomate, a través de la sensibilidad al etileno por la planta. Aunque ambas cepas promovieron el crecimiento, la inoculación de las PGPB afectó los parámetros fisiológicos y los niveles de metabolitos de la raíz en plantas juveniles. Por otra parte, la insensibilidad al etileno perjudicó gravemente la interacción de *B. megaterium* con plantas de tomate, lo que resulta en modificaciones fisiológicas y pérdida de la actividad de PGPB. El peso seco de la raíz aumentó con la inoculación de las PGPB en 15,8% y 18,1%, sin diferencias significativas en las plantas (16).

1.2. Microorganismos psicrófilos

En la actualidad, la mayoría de estudios en microorganismos psicrófilos, han sido enfocados en la obtención de enzimas a ser utilizadas en procesos industriales. Estos hallazgos se han determinado en estudios como el realizado por Trindade et al, en el 2002, donde encontraron que especies de *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, realizan actividad proteolítica, pectinolítica y capacidad de hidrolizar la arbutina, estas lo realizan en frutos de Brasil a bajas temperaturas, como es en el caso de pulpa congelada de los frutos (17). Nakagawa et al., en el 2004, estudiaron las capacidades que tienen levaduras psicrófilas (*Cryptococcus cylindricus*, *Mrakia frigida*, *Cystofilobasidium capitatum*) de degradar pectina usándola como fuente de carbono a bajas temperaturas (5°C) (18). Estos hallazgos sobre la actividad de estas enzimas, podría tener aplicación en la industria alimenticia y otros campos. Margesin et al, en el 2005 estudiaron la producción de la enzima pectato liasa alcalina (PL), en la levadura psicrófila *Mrakia frigida*, crecida en rangos de temperatura de 1° a 15°C. La producción de estas enzimas activadas por frío, son promisorias para el tratamiento a bajas temperaturas de aguas residuales que puedan contener sustratos pépticos(19).

Thomas-Hall et al. 2009, describieron nuevas especies de levadura psicrófilas aislada de los glaciares, las cuales son: *Mrakia robertii sp.*, *Mrakia blollopis sp.*, y *Mrakiella niccombsii sp.*, estas las estudiaron con el fin de conocer cuáles de estos microorganismos sobreviven aún en los glaciares, puesto que actualmente estos se encuentran afectados por el calentamiento global, por lo tanto en estas especies de microorganismos hay una alta tasa de mortalidad debido a que su crecimiento se da en temperaturas menores a 20°C, y los cambios climáticos han hecho que cada vez la concentración de este tipo de levaduras disminuya. Este estudio se hizo con pruebas filogenéticas y morfológicas, con estas pruebas encontraron que su conservación se puede dar *in situ*, evitando así su extinción en un futuro, además se encontró que éstos pueden usarse en biotecnología (20). En el mismo año Jiant et al. evaluaron el transcriptoma de tomate Cherry después de interacción con la levadura *Cryptococcus laurentii*, y observaron que la levadura confiere resistencia a la planta a diferentes enfermedades, además de contribuir a la disminución de estrés de la misma (21).

Por otra parte, poco se conoce sobre la presencia de estos microorganismos en rizósfera, y hojas en diferentes plantas, como tampoco en su utilización como microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Algunos estudios, se mencionan a continuación. Duarte et al, en el 2013, analizaron levaduras de la Antártida, con el fin de saber si producen lipasas, proteasa, xilanasas, estas levaduras se obtuvieron de ecosistema marinos y terrestres, este estudio determinó que levaduras del género *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Cándida*, se encontraban con mayor abundancia y producen las enzimas en bajas temperatura, siendo punto clave para el uso de las mismas en biotecnología (22). Otros hallazgos han descrito la presencia de levaduras endófitas a partir de cultivos de importancia agrícola como tomate, maíz, frutales, caña de azúcar, entre otros (12)(23).

En el año 2015 Saha y Sello, realizaron una investigación que relacionan la interacción *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1-y plantas de arroz, y evalúan los genes expresados en la planta, y observan que los genes mayormente sobre expresados fueron genes del metabolismo, transducción de señales y respuesta a estrés, lo que podría potenciar la síntesis de proteínas que confieren protección a la planta y al fruto a factores externos y a patógenos (24). En este mismo año Balcázar et al, aislaron especies de *Pseudomonas*

(*P. fragi*, *P. psychrophila*, *P. orientalis*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. antártica*), de glaciares en los Andes Venezolanos a 4.900 msnm. Las cepas fueron productoras de AIA, HCN y solubilizan fosfato en temperaturas de 4°C, 15°C y 30°C. Además, se evidenció su efecto como PGPB, y tuvieron un efecto antagónico sobre fitopatógenos como *P. ultimum*, *F. oxysporum* y *P. infestans*.(9) Este estudio apoya el uso de microorganismos psicrófilos para ser utilizados como biofertilizantes para uso agricultura en lugares montañosos. Adicional Duarte et al, en el 2016 aislaron levaduras de los géneros *Rhodotorula*, *Glaciozyma*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus* y *Mrakia*, de fitoplancton, algas y líquenes de la Antártica, sugiere que estos sustratos son de gran importancia para la adaptación de las levaduras al frío, permiten su supervivencia y desarrollar interacciones benéficas entre ambos participantes (22).

1.3. Tolerancia a concentraciones salinas por microorganismos.

Desde hace varios años los agricultores han tenido problemas con su producción debido a la salinidad de los suelos, esto se debe a varios factores antropogénicos, como la minería o el uso excesivo de químicos en el suelo. Desde hace algunos años se han venido estudiando microorganismos que son capaces de crecer en ambientes extremos, en los cuales se pensaba que no podía haber vida. La evolución, la adaptabilidad y selección natural han permitido que los microorganismos desarrollen estrategias metabólicas para adaptarse a dichos ambientes, estos microorganismos son llamados extremófilos, siendo muy útiles en el desarrollo de la biotecnología. En el 2004 Ramírez et al, refiere a los microorganismos no halófilos aquellos que son capaces de crecer en ausencia de sal, y otros en diferentes concentraciones de esta, estos microorganismos son llamados halotolerantes. Estos microorganismos han sido estudiados como un gran potencial biotecnológico, como en la producción de enzimas, solutos, degradación de residuos y adaptación a suelos infértiles por la salinidad (25).

Asimismo, otros estudios han evaluado que estos microorganismos son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales, las cuales se encuentran en las aguas de riego y en los suelos agrícolas. Según datos de la FAO, el 6% de las tierras están afectadas por sales, con más de 800 millones de hectáreas en todo el mundo. Las mayores incidencias se localizaron en Asia, Pacífico y Australia (6,3%), seguido por Europa del Este (5,1%) y América Latina (3,0%) (1). Este tipo de situaciones ha llevado a diversas investigaciones, Karlidag et al, en el 2013 estudiaron bacterias de la rizosfera que pueden ayudar a detener el estrés salino en cultivos y además promuevan el crecimiento cultivos de tomate, berenjena, calabacín, alcachofa y en su estudio la planta de fresa. Aislaron 44 rizobacterias de plantas en suelos salinos y seleccionaron cinco PGPR (*Bacillus subtilis* EY2, *Bacillus atrophaeus* EY6, *Bacillus sphaericus* EY30 B, *Staphylococcus kloosii* EY37 y *Kocuria erythromyxa* EY43). Este estudio determinó que la aplicación de estos microorganismos logra que la planta tenga un mayor crecimiento, logrando así la mitigación de estrés salino, además del aumento de clorofila y otros elementos como N, K, P, entre otros (26).

Adicional Wilson Ceiro et al, los cuales en el 2014 evaluaron la capacidad de crecimiento de hongos y su esporulación en suelos con diferentes tipos de concentraciones salinas,

este estudio evidenció que *Pochonia chlamydosporia* persiste y proliferan en todas las concentraciones de NaCl usadas en medio PDA y suelo Fluvisol, y puedes ser un candidato promisorio para el bio manejo de plagas en agro ecosistemas con problemas de salinidad (27).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Generalidades del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate es considerado Mesoamericano, ya que se ha cultivado incluso antes de la conquista de América, y las culturas lo han usado en su dieta diaria incluso antes de los europeos. También se habla que su nombre proviene de la palabra tomatl (objeto gordo) que fue traducido a tomate por los europeos en la conquista. Por otra parte, se dice que el tomate del género *Solanum*, es de origen Andino aunque no hay evidencia que compruebe esto, sin embargo se dice que la dispersión de este se dio por la conquista y así logró llegar a México. Además se encontró que en Europa se comenzó a cultivar y a consumir entre los siglos XVI-XVIII, después de que los conquistadores llegaron a América. Toda esta migración de la hortaliza hizo que su fruto comenzará a tener alteraciones a nivel de la variabilidad genética, esto ha llevado a que desde el siglo XX se comenzará a estudiar toda la genética de la hortaliza, como es en el caso de Colombia, en donde se llevó a cabo el estudio fenotípico del tomate del género *Solanum* en 1985(28).

Estas investigaciones acerca de la proveniencia del tomate, ha llevado que los productores de tomate a la hora de realizar los cultivos tengan en cuenta tanto los requerimientos nutricionales como los hídricos, los cuales se aplican en las tres diferentes fases que posee la hortaliza; Todos estos requerimientos se deben tener en cuenta, ya que según su aplicación puede ser favorable o no, incluso con pérdidas económicas considerables. Las tres fases por las que pasa el tomate son:

- **Iniciación:** Esta fase es la siembra de las semillas en los germinadores, en donde se desarrolla la parte aérea de la planta, en donde la planta inicia sus procesos de absorción de nutrientes y fotosíntesis, esta fase consta de una duración de aproximadamente dos semanas (29).
- **Crecimiento vegetativo:** En esta fase la planta exige mayor cantidad de nutrientes, debido al requerimiento de sus hojas, tallo y expansión de esta, esta fase dura aproximadamente 5 semanas(30).
- **Reproductiva:** En esta etapa la planta inicia con la aparición de nuevas hojas y racimos florales los cuales por medio de la fecundación a partir de los cuales se van formando progresivamente los frutos(31).

2.2. Descripción morfológica y edafoclimatológicas de *Solanum lycopersicum*

2.2.1. Taxonomía.

Después de su introducción al continente europeo los botánicos clasifican el tomate dentro del género *Solanum*, debido a su relación con este. Más adelante en el siglo XX el botánico Tournefort, clasificó este tomate en el género *Lycopersicon* debido a sus frutos multiloculares. Ya para el 1753 Linnaeus le dio el nombre específico de *Solanum lycopersicum*, por estudios taxonómicos en la planta, pero en el año 1754 Philip Miller

lo clasificó en *Lycopersicum esculentum*, nombre que han adoptado diversos botánicos (32)

En la actualidad se adopta el nombre dado por Linnaeus debido a que estudios moleculares han demostrado que este botánico estaba más acertado al realizar la clasificación en el género *Solanum* (33) y el código internacional de nomenclatura botánica también toma este género para realizar la clasificación del tomate (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta de tomate *Solanum lycopersicum*.

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Trachobiota</i>
Subdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Lycopersicum</i>

Tomada de: Salud y buenos alimentos. (34)

2.2.2. Morfología.

El tomate es una planta de crecimiento rastrero, semierecta o erecta, dependiendo de su hábitat de crecimiento. En la Figura 1, se puede observar las partes de la planta de tomate.

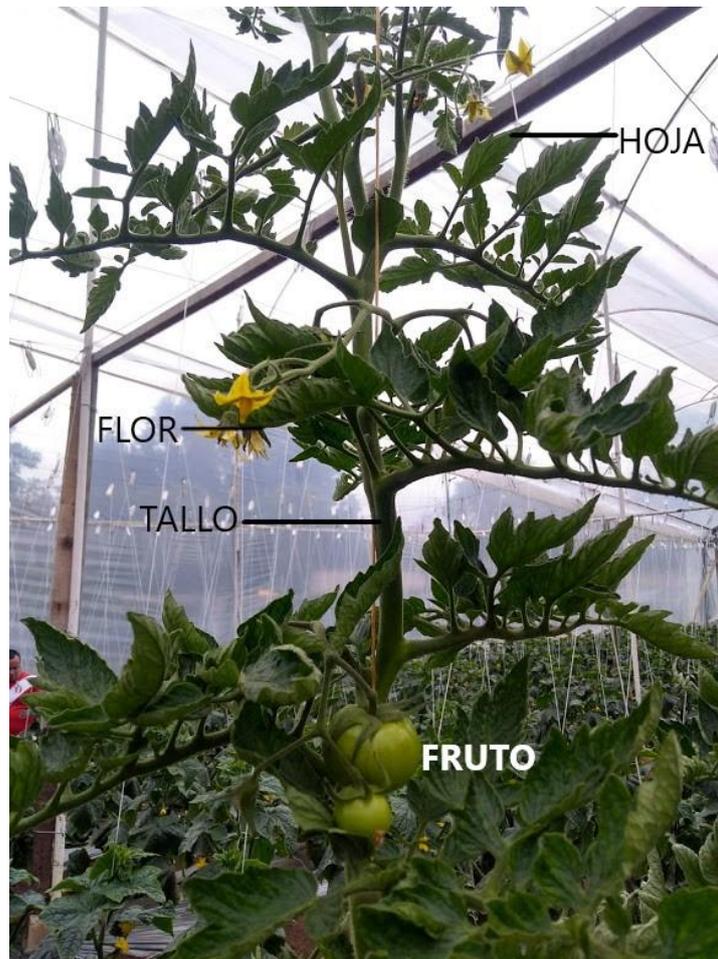


Figura 1. Morfología del tomate. Tomada de: Autoras

- **Tallo:**
La planta de tomate tiene un tallo grueso de 2.0 a 4.0 cm de ancho el cual tiende a ser más delgado en la parte superior, es pubescente, de color verde. Desde el tallo principal se generan tallos secundarios los cuales tienen las hojas y las flores(36).
- **Hojas:**
La posición de las hojas en el tallo puede ser semierecta, horizontal o inclinada, las cuales se distribuyen de forma paralela. Son de color verde, pubescente por el haz y de color ceniciento por el envés (35).
- **Flores:**
Son de color amarillo, el cáliz está constituido por cinco o más sépalos y pétalos, los estambres están alternados entre los pétalos. Los pétalos, sépalos y estambres se insertan en la base del ovario, formando los órganos de reproducción. Su inflorescencia es de tipo racimo en grupos de tres a diez, las cuales se ubican cada dos o tres hojas (29).
- **Fruto:**
El fruto en estado inmaduro es de color verde y cuando madura es de color rojo, es carnoso, su interior se encuentra dividido en varias partes o poseer dos lóculos. Su forma puede ser semiesférica o carecer de uniformidad encontrando diferentes

formas. Su mesocarpio es grueso, en el endocarpio se encuentran las semillas, que son numerosas, su forma es ovalada que pueden llegar a medir aproximadamente 0,5 por 0,4 por 0,2 cm, cada semilla está compuesta por el embrión, el endospermo y la cubierta seminal (37).

- **Sistema radicular:**

Está constituida por la raíz principal, raíces secundarias y adventicias, las cuales ayudan al anclaje de la planta, absorción y transporte de nutrientes y agua a la parte aérea de la planta. La parte interna de la raíz está integrada por epidermis la cual tiene pelos para la absorción de nutrientes y agua, mientras que el córtex y los cilindros vasculares tienen la función de transportar los nutrientes(38).

2.2.3. Condiciones edafoclimáticas.

El tomate crece desde 0 msnm hasta 1500 msnm, su temperatura (T°) más adecuada está entre 20 a 25°C en el día, en la noche en un rango de 15 a 20°C. Estas temperaturas favorecen el crecimiento, la floración, fructificación y los procesos bioquímicos. La temperatura no puede superar los 32°C, debido a que esto lleva a un deterioro progresivo de la planta.(39)

La humedad relativa (HR) óptima debe ser entre 60 a 85% para un buen crecimiento, desarrollo y producción de la planta. Se debe tener un riego uniforme y frecuente, ya que de este depende el desarrollo y producción de la planta.

El suelo para el crecimiento de la planta de tomate debe contener niveles elevados de materia orgánica y agua. Debe tener una densidad menor o igual a 1,8g/cm³ y su pH se debe mantener entre 6.0 a 7.0. (38) En cuanto a la salinidad la planta de tomate puede crecer en una salinidad máxima de 6400 ppm (36).

2.3. Importancia del tomate a nivel mundial y nacional

En Colombia y a nivel mundial la producción de tomate ha ido en aumento. La Organización de Naciones Unidas para la alimentación y agricultura, estableció que, de los cinco continentes del mundo, Asia es el mayor productor de tomate (107,231,248 toneladas) en el periodo del 2015-2017, seguido de las Américas (25,907,713 toneladas) Europa (24,490,820 toneladas) y África (21,685,235 toneladas), y por último se encuentra Oceanía, siendo el continente con menos producción (455,262 toneladas) (1).

A nivel de Colombia el ministerio de agricultura y desarrollo rural, en el año 2017 reportó un aumento en la producción de este cultivo, teniendo en cuenta que Antioquia se posicionó como el departamento con mayor producción a nivel nacional, seguido de Norte de Santander, Boyacá, Cundinamarca y Santander, a continuación se muestra la cantidad en toneladas producidas en el año 2017, por los 5 mayores productores en Colombia (2).

Tabla 2. Cantidad de toneladas de tomate producidas en los cinco departamentos más productores en Colombia.

DEPARTAMENTO	TONELADAS PRODUCIDAS/2017
Antioquia	156.421t
Norte de Santander	86.017t
Boyacá	72.851t
Cundinamarca	70.631t
Santander	65.948t

Tomada de: Agro negocios. (2)

2.4. Valor nutricional

A lo largo de los años se reconoce que el tomate no es solo utilizado por su gran sabor y su alta producción, adicional a esto se caracteriza por ser una hortaliza con diversas propiedades nutricionales, ya que es conocido como un alimento “funcional”, lo cual indica que es un alimento que ayuda a la salud, y esto ha llamado de la atención de muchos, debido a que este posee ingredientes biológicos, que cumplen la función de evitar algunas enfermedades, estos compuestos bioactivos son (40):

- Carotenoides
- Vitaminas.
- Compuestos fenólicos.
- Glicoalcaloides

2.5. Enfermedades que afectan al Tomate (*Solanum lycopersicum*)

A pesar que el tomate se produce en altas cantidades, a lo largo de los años la susceptibilidad a enfermedades, viene en aumento, ya que esta hortaliza se enfrenta a todos los cambios climáticos (Tabla 3).

Tabla 3. Principales enfermedades bacterianas y fúngicas que afectan al tomate. Autoras.

Enfermedad	Patógeno	Bacteria	Hongo	Manejo
Podredumbre blanca	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		X	Para este hongo se recomienda la eliminación de malas hierbas, desechos post-cosecha y plantas enfermas, adicional se debe manejar la ventilación, riego y solarización(41).

Mildiu	<i>Phytophthora infestans</i>		X	El manejo se basa principalmente en la eliminación de frutos y plantas ya enfermas, para así usar nuevamente plántulas sanas, controlando la ventilación y el riego(36).
Mal de talluelo	<i>Pythium aphanidermatum</i>		X	Cuando esta se presenta, se recomienda hacer cultivos en invernadero, bajando la cantidad de riego, para así evitar un exceso de humedad y empozamientos en las plantas(41).
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>		X	Se recomienda la eliminación total de las plantas enfermas, con rotación del cultivo, cambio de semillas por unas resistentes y desinfección constante de herramientas de trabajo(36).
<i>Verticilium dahliae</i>	<i>Verticilium dahliae</i>		X	El manejo inicia con la destrucción residuos post-cosecha antes de iniciar nuevos cultivos, adicional se sugiere usar variedades con el gen V. Finalmente esto acompañado de solarización(41).
Mancha negra del tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	X		Inicialmente el manejo se da con la eliminación de frutos, hierbas y plantas con la enfermedad, seguido del uso de semillas desinfectadas y abono equilibrado(41).
Maya o mancha bacterial	<i>Ralstonia solanacearum</i>	X		Se trata con plántulas sanas y/o resistentes, uso de drenajes en los cultivos, eliminar plantas enfermas, desechos post-cosecha y realizar aplicaciones de <i>Trichoderma</i> dirigido al suelo y planta(36).
Necrosis de la médula	<i>Erwinia carotovora</i>	X		Se debe eliminar todas las plantas enfermas y residuos post-cosechas, acompañado de la esterilización de semillas (36).

2.6. Características generales de las levaduras.

Por varios años los hongos eran catalogados como plantas simples, pero esto cambió debido a que sus características morfológicas no se relacionaban con estos organismos, lo que llevó

a la creación del Reino Fungi, donde 250.000 especies forman este reino. Los hongos son microorganismos eucariotas, heterótrofos, de vida saprofita o parasitarios que pueden crecer de forma levaduriforme o micelial. Existen hongos dimórficos, que dependiendo de la temperatura de crecimiento pueden ser levaduras u hongos filamentosos (42).

Las levaduras son microorganismos unicelulares y su reproducción puede ser asexual (gemación) o sexual mediante la formación de esporas. Se caracterizan por poseer células de mayor tamaño que las bacterias y su morfología es comúnmente esférica u ovalada. Se diferencian de los hongos filamentosos debido a que sus colonias comúnmente son de crecimiento rápido y pueden ser de color blanco con pigmento rosadas o naranja. Su pared está compuesta principalmente de quitina (*N*-acetilglucosamina), glucanos y proteínas. Las levaduras usan carbohidratos como la glucosa y maltosa como fuente de energía, y compuestos de nitrógeno usados para sintetizar sus propios aminoácidos y proteínas (43).

A nivel nutricional se basa en la producción de exoenzimas hidrolíticas que cumplen la función de digerir sustratos del ambiente, estos sustratos son usados como fuente de carbono, electrones y energía. Estos son usualmente aerobios sin embargo existen levaduras anaerobias facultativas que obtienen energía por medio de la fermentación (43). Esto último, ha hecho que hace un siglo estos microorganismos tenga relevancia a nivel alimentario, para la producción de cerveza, vino, pan y antibióticos, entre otros (25)

En los últimos años estos microorganismos han sido más estudiados por sus capacidades biotecnológicas siendo de gran utilidad no solo en la industria alimentaria y de bebidas, sino también en la producción de vitaminas, pigmentos, cofactores, extractos y producción de biomasa, además de ser útiles en la industria biomédica para la producción de antibióticos, y en la industria agrícola como potenciales biofertilizantes (44)

2.7. Generalidades de Microorganismos *Psicrófilos*

Los psicrófilos forman parte del amplio grupo de microorganismos extremófilos; están presentes en los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) y se clasifican como psicotolerantes si crecen en temperaturas superiores 25°C, pero también a 15°C, y psicrófilos si crecen a temperaturas entre 10 a 20°C, aunque pueden crecer a temperaturas por debajo de 5°C (44-45). En estas temperaturas su actividad metabólica es necesaria para asegurar procesos de descomposición de materia orgánica y proporcionar nutrientes a las plantas, por lo que juegan un papel fundamental en el ciclo del carbono de los ecosistemas polares (19)(46). Los microorganismos psicrófilos y psicotolerantes han desarrollado diversas adaptaciones estructurales y funcionales que les permite sobrevivir en entornos hostiles, y parece ser que la producción de compuestos extracelulares sería una ventaja particular en la reducción de la competencia inter-especie(47). Los psicrófilos han mostrado ser efectivos en biorremediación de suelos alpinos contaminados con petróleo, y en la producción de crioprotectores usados en agricultura, cosmética y medicina (20).

Dentro de las levaduras psicrófilas, las especies del género *Mrakia* son las más representativas en estos ecosistemas, y las especies principalmente aisladas incluyen *M. frígida*, *M. nivalis*, *M. gélida*, *M. stokesii*, *M. blollopsis*, *M. psychrophila*, *M. robertii*, y *Mrakiella niccombsii* sp.(20). Se caracterizan por acumular alta cantidad de lípidos

insaturados, lo que les permite mantener la fluidez de la membrana celular y acumular glicerol como un crioprotector, permitiendo su adaptación a condiciones de frío. Al igual que otras levaduras psicrófilas, acumulan altos niveles de metabolitos del ciclo de ácidos tricarboxílicos, ácido láctico, aminoácidos aromáticos y poliaminas, los dos últimos importantes en procesos de desarrollo y crecimiento a bajas temperaturas.(46)

2.8. Efecto del estrés salino en los microorganismos.

La salinización de los suelos es producto de la sobre utilización de fertilizantes, el riego de cultivos con agua de mala calidad, el mal drenaje y la tala descontrolada de árboles, influyendo de manera directa sobre la fisiología, morfología y procesos bioquímicos de la planta, lo que limita la productividad de los cultivos y su interés económico, además de afectar a la planta, este estrés daña otros ecosistemas como lo son los microorganismos del suelo. Los hongos parecen ser más vulnerables al estrés salino que las bacterias, afectando diversos procesos, entre los que se destaca el aumento del potencial osmótico, el cual produce deshidratación y lisis celular, adicional se ve afectada la estructura del suelo, debido al aumento de diferentes cationes y aniones de sales creando un desequilibrio en la composición del suelo, lo que conlleva la reducción de la actividad y cambios en la estructura microbiana del mismo. Como consecuencia a estos efectos, los microorganismos han adquirido capacidades tales como la acumulación de prolina y glicina, con el fin de disminuir los daños causados en el suelo, debido a que estos osmolitos orgánicos aumentan la energía y mitigando el estrés (11).

2.9. Mecanismos de acción de microorganismos promotores de crecimiento vegetal

2.9.1. Solubilización de fosfatos.

El fósforo (P) es un macronutriente importante para el desarrollo biológico, esencial en los procesos nutricionales de las plantas, puede encontrarse en grandes cantidades en el suelo, en forma orgánica e inorgánica. El fósforo es indispensable debido a que constituye más del 0,2 % del peso seco de la planta. La mayoría del P disponible en el suelo es insoluble, la disponibilidad de este elemento para las plantas es baja en sus formas solubles; monobásica: H_2PO_4^- y dibásica: HPO_4^{2-} , ya que se mantienen en bajas concentraciones. Durante un siglo los investigadores han estudiado la capacidad de algunas bacterias para disolver los fosfatos poco solubles, estos microorganismos son conocidos como bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB)(48).

Las plantas no poseen la capacidad de sintetizar el fósforo (P), por esta razón deben tomarlo del suelo, el cual está disponible como iones ortofosfatos (HPO_4^{2-}), cuya concentración varía según el trato del suelo y ubicación del mismo.(49)

La solubilización del fósforo orgánico se debe a la acción de enzimas hidrolíticas extracelulares las cuales permiten la reducción de las macromoléculas a oligómeros, monómeros y iones pequeños. Estas enzimas se clasifican en tres grupos. (5)

1. Las fosfomonoesterasas efectúan la desfosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhídros presentes en la materia orgánica.
2. Las fitasas, las cuales liberan el fósforo del ácido fítico.
3. Fosfonatasas y liasas de carbono-fósforo, enzimas que llevan a cabo el clivaje del enlace C-P presente en fosfonatos orgánicos.

Por otra parte la solubilización del fósforo (P) inorgánico el cual forma enlaces de gran estabilidad con otros compuestos como hidróxido de hierro, aluminio o manganeso, tiene dos mecanismos para su solubilización (5).

1. Un intercambio del ácido, por ejemplo, los H⁺ provenientes del citrato se intercambian por el fósforo ligado a la superficie de los cristales del Al (OH)₃ o Fe (OH)₃, los reducen y liberan el fósforo.
2. Depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos, ya que a través de sus grupos hidroxil y carboxil se quelan los cationes unidos al fosfato y lo convierten en formas solubles (5).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato, movilizan fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces, y las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano. Otro mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados es la disminución de pH extracelular, esta disminución de pH se debe a la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los microorganismos, los cuales produce liberación del fosfato. Estos ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, péptidos y lípidos. Algunos ácidos orgánicos implicados en la solubilización es el ácido glucónico como el agente más frecuente en la solubilización de fosfatos, el cual es producido por especies de *Pseudomonas* y también encontramos el ácido 2-cetoglucónico sintetizado por *Rhizobium leguminosarum* (50)

Se ha estudiado la viabilidad de microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos fríos de desiertos de Lahaul y Spiti en la región india del Trans-Himalaya, los cuales tienen alta alcalinidad, baja humedad, bajo contenido de materia orgánica y por ende bajo contenido de fósforo soluble, el cual se encuentra fijo en el suelo por el alto contenido de calcio, el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) podrían mejorar la productividad de dichos suelos (51).

Los principales microorganismos solubilizadores de fosfatos son: *Achromobacter xylooxidans*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. awamori*, *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *Brevibacillus brevis*, *Burkholderia sp.*, *B. cepacia*, *B. unamae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sp.*, *E. cloacae*, *Klebsiella sp.*, *K. pneumoniae*, *Micrococcus sp.*, *Penicillium oxalicum*, *Phosphobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *Rhizobium sp.*, *Rhodopseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *S. marcenscens*, *Thiobacillus s* (5).

2.9.2. Fijación de Nitrógeno

El nitrógeno es otro macronutriente importante para las plantas, ya que se encuentra en la conformación de aminoácidos y proteínas. La fijación de nitrógeno es otro mecanismo utilizado por los microorganismos, para que las plantas puedan asimilar el nitrógeno, en forma de (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) . Algunos géneros de bacterias mejor estudiados en fijación de nitrógeno son: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Anabaena*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, entre otros (5).

La fijación de nitrógeno es una alternativa para la recuperación y productividad de los suelos. La reducción de N_2 a NH_4 está catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, en el cual actúan dos proteínas, dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa codificadas por los genes (genes nif), las cuales son metaloenzimas, que requieren hierro y el molibdeno formando un cofactor llamado FeMo-co, el cual es el centro donde ocurre la reducción de N_2 (52-53). La fijación biológica de nitrógeno es una buena alternativa tanto para el ámbito ecológico y económico dentro de las actividades agrícolas (53).

2.9.3. Ácido Indolacético

Las auxinas son hormonas de crecimiento de plantas, debido a que estimulan el crecimiento en respuesta a estímulos de luz. También son producidas por el 80% de microorganismos utilizados como biofertilizantes. El ácido-3-indolacético (AIA), es la auxina que más se produce y su efecto es mejorar la arquitectura de la raíz, incrementando el crecimiento de la raíz principal, y formación de raíces laterales, para permitir una mejor absorción de nutrientes y agua, promoviendo el crecimiento vegetal y el rendimiento del cultivo. Los microorganismos con mayor producción de auxinas son *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp* (6). El AIA es sintetizado en la planta a partir del L-triptófano, que puede estar libre o formando parte de proteínas (54).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación: Mixto

Enfoque de la investigación: Experimental y Descriptivo

Universo: Plantas y Levaduras

Población: Plantas de tomate *Solanum lycopersicum*

Muestra: Las cepas de levadura fueron donadas por el Dr. Ramón Batista García de la Universidad Autónoma del estado de Morelos-México. 6 levaduras psicrófilas (2 *Rhodotorula spp*, 3 *Mrakia spp* identificadas por 18s ribosomal y una levadura denominada blanca, por sus colonias blancas en caja de Petri, de la cual no se tiene identificación genotípica), fueron aisladas del volcán Xinentécatl (nevado de Toluca), a partir de rizósfera de una planta nativa que se encontraba creciendo en sustrato arcilloso, sobresaliendo entre un montículo de nieve, y a partir del mismo sitio, a una distancia de 40 cm aproximadamente se tomó una muestra de suelo nevado (5 cm debajo de la superficie).

Hipótesis: Las levaduras psicrófilas son capaces de promover el crecimiento vegetal en la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*), utilizando mecanismos de acción tales como solubilización de fosfatos y AIA, además de tolerar altas concentraciones de sal, lo que indica que son microorganismos potenciales para ser usados como biofertilizantes, siendo así una biosolución para el medio ambiente y los agricultores.

PROCEDIMIENTO POR OBJETIVO

3.1.1. Objetivo 1.

Evaluar el efecto de las levaduras psicrófilas en la promoción de crecimiento en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero.

- **Variable independiente:** Microorganismos Psicrófilos
- **Variable dependiente:** Peso seco vástago, peso seco raíz y peso seco total, peso fresco del vástago, peso fresco de la raíz, peso fresco total, longitud de la raíz, longitud del vástago, longitud total.
- **Indicador:** Incremento porcentual de las variables dependientes respecto al control negativo.
- **Técnicas:** Se realizaron bioensayos en condiciones de invernadero de promoción de crecimiento en plántulas de tomate variedad Río Grande inoculadas con las levaduras psicrófilas y se evaluaron parámetros de crecimiento como peso seco de raíz, vástago y total,

peso fresco de raíz, vástago y total y longitud de la raíz, vástago y total. Para esto se realizaron las siguientes etapas experimentales:

- **Aislamiento y pureza de levaduras psicrófilas:**

Para obtener los aislamientos puros, las cepas se sembraron a partir de las cepas conservadas en glicerol (-70°C), en medio agar Sabouraud, se incubaron por 48 h a 18-22°C. Posterior al tiempo de incubación, se observó crecimiento uniforme de las unidades formadoras de colonia (UFC) en el medio de cultivo Sabouraud, se realizó tinción de Gram de cada una de las cepas para verificar la pureza de las mismas.

- **Ajuste de Pre-inóculo e inóculo:**

Se evaluó la pureza de la cepa, y se inoculó una UFC de los aislamientos en 5.0 ml de caldo Sabouraud en tubos falcón de 10 ml, se incubaron a 18-22°C por 48 h a 180 rpm. Pasadas las 48h el cultivo se centrifugó a 7.500 rpm durante 5.0 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5.0 ml de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión, se prepararon los inóculos en agua destilada estéril ajustando a una densidad óptica de 0.4 a 600 nm, usando como blanco agua destilada.

- **Lavado de Semillas:**

Se utilizaron semillas variedad Río Grande, se desinfectaron con hipoclorito a 5% por 3 minutos, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril, seguido de un lavado con alcohol al 70% durante un 1.0 min, para finalmente lavar 3 veces con agua destilada estéril, el proceso se realizó hasta que las semillas quedaron opacas, este proceso de desinfección se realizó con el fin de retirar fungicida y garantizar la ausencia de otros microorganismos (Figura 2A) (Anexo 1).

- **Siembra y Germinación:**

En turba previamente estéril se sembró una semilla en cada pozo del germinador de 72 pozos (figura 2B) (Anexo 12). Las semillas fueron regadas cada día de por medio con 3.0 ml de solución Hoagland por 20 días (figura 2C) (Anexo 2)

- **Raleo, trasplante e inoculación:**

Pasados los 20 días de germinación, las plantas con 4 hojas verdaderas (Anexo 4), se trasplantaron a vasos (7 onz), con tierra estéril, una planta por vaso (Anexo 5). Las plantas se inocularon con 1.0 ml de inóculo (DO: 0.4), de cada cepa, y las plantas control con 1.0 ml de solución Hoagland (Anexo 2). Las plantas se regaron cada día de por medio con 5.0 ml de solución Hoagland por 30 días (figura 2D).

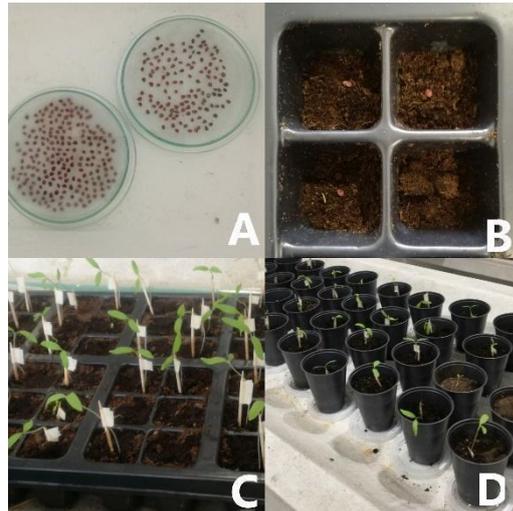


Figura 2. Planta de tomate *Solanum lycopersicum*. A. Semillas desinfectadas. B. Siembra de semillas. C. Germinación de plántulas de tomate. D. Plántulas trasplantadas.

- **Recolección de muestras:**

Pasado los 30 días de interacción planta-microorganismo, se retiró el suelo de la raíz con agua de grifo. Se midió la longitud de cada planta completa (Anexo 6) y para medir peso fresco se dividió la parte aérea y radicular (Anexo 7-14). Posterior, se colocaron cada una de las partes de cada planta 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 (Anexo 7-14). Los resultados fueron analizados en el sistema estadístico usado ANOVA.

3.1.2. Objetivo 2

Caracterizar los mecanismos de acción de las levaduras psicrófilas promotoras de crecimiento en plantas de tomate.

- **Variable independiente:** Microorganismos Psicrófilos
- **Variable dependiente:** Metabolitos
- **Indicador:** Incremento porcentual de las variables dependientes respecto al control positivo.

Técnicas: El análisis se evaluó con técnicas de espectrofotometría rayos UV y fotometría en equipo NOVA.

Análisis cuantitativo de metabolitos

- **Análisis de ácido indolacético (AIA), método Salwosky**
 - **Pre-inóculo e inóculo:** Se realizó un pre-inóculo de cada una de las cepas en caldo Sabouraud por 48 hrs a 22°C a 180 rpm. Pasadas las 48 hrs se centrifugaron a 10000 rpm a 5.0 minutos, el pellet se resuspendió en solución salina 0,85% y a partir de esta suspensión se ajustó el inóculo a una D.O. de 0.9 a 546 nm. Posteriormente, se tomaron 100µl del inóculo de cada cepa y se agregaron a 9 ml de caldo Sabouraud con 1 ml de L-triptofano y se incubaron a oscuridad por 96 horas a 20°C en constante agitación, técnica basada en el método de Malik y Sindhu (2008) (55). (De cada muestra se realizaron 3 replicados)
 - **Determinación de ácido indolacético (AIA):** Pasadas las 96 horas, se tomó 1ml del inóculo se dispuso en tubos eppendorf de 1.5 ml para después centrifugar a 10000 rpm por 5.0 minutos, posteriormente se tomaron 700µl del sobrenadante y se mezclaron con el reactivo de Salwosky, se dejó reaccionar por 30 minutos a oscuridad y agitación, para finalmente leer la absorbancia a 546 nm y determinar la concentración mediante una curva estándar de AIA con rangos de 0-100-200-400-600-800 y 1000.

- **Análisis de solubilización de fosfatos-método colorimétrico**
 - **Pre-inóculo:** De cada una de las cepas a evaluar, se tomó una UFC de los aislamientos y se cultivaron en tubos falcón con 3.0 ml de caldo Sabouraud a 20°C por 48 hrs a 180 rpm y este se ajustó a una densidad óptica de 0.9..
 - **Evaluación cuantitativa de la actividad solubilizadora de fosfato:** Para determinar aquellas levaduras que poseen la actividad solubilizadora de fosfatos, de la suspensión anterior de cada cepa, se tomaron 12 µl y se agregaron a 6.0 ml del medio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth médium) con un pH 7.0 y fueron incubadas por 6 días a 20 °C a 180 rpm, técnica basada en el método de Teng et al.(2018)(56). (De cada muestra se realizaron 3 replicados)
 - **Lectura de solubilizadores de fosfatos:** Pasados los 6 días, se centrifugaron los tubos a 7000 rpm/5.0 min, se tomaron 5.0 ml del sobrenadante y se midió la concentración de fosfato soluble mediante el kit de fosfatos Spectroquant de Merck), y tomando la curva estándar de fosfato del equipo NOVA 60^a.

- **Análisis de producción de amonio y fijación de Nitrógeno**
 - **Evaluación de fijación de nitrógeno:** La evaluación de fijación de nitrógeno se realizó en medio NF semisólido usando el protocolo modificado de Döbereiner (1988) (Anexo 11) (57). Las cepas fueron sembradas en el medio por agotamiento y se incubaron a temperatura ambiente por 4 días. Pasado el tiempo de incubación se verifico si había crecimiento en las cajas. El ensayo se hizo por triplicado.

Evaluación cuantitativa de producción de amonio

- **Pre-inóculo e inóculo:** Se preparó un pre inóculo a partir de un UFC en 5.0 ml de caldo Sabouraud en tubos Falcón de 10 ml, se incubó a 22 °C por 4 días a 180 rpm. Se centrifugaron los tubos Falcón a 6500 rpm por 5.0 min a temperatura ambiente, se ajustó el inóculo a una densidad óptica de 0,9. De esta suspensión se tomaron 100 µl y se agregaron a 6.0 ml de agua peptonada y se incubaron por 5 días a 20°C en agitación continua, técnica basada en el método de Ahmad et al. (2008) (57).
- **Determinación de la producción de amonio**

Pasado los 5 días, se centrifugaron los tubos con cultivo a 7000 rpm durante 10 minutos y se tomaron 5.0 ml del sobrenadante y se sometieron al protocolo del kit de Spectroquant Test Amonio usando espectrofotómetro NOVA 60A. La concentración de amonio se determinó bajo la curva estándar de amonio del equipo. (Cada muestra fue realizada por triplicado)

3.1.3. Objetivo 3

Evaluación de la tolerancia de las levaduras psicrófilas a diferentes concentraciones salinas

- **Variable independiente:** Microorganismos Psicrófilos
- **Variable dependiente:** Crecimiento en las condiciones evaluadas
- **Indicador:** Incremento o disminución del crecimiento de los microorganismos con relación al control positivo y negativo.

Técnicas: Se realizaron cultivos en medio Sabouraud, de cada levadura por triplicado, en cuatro concentraciones de sal (25, 50, 100 y 200 mM), comparando el crecimiento con el control negativo sin sal.

- **Aislamiento:** Para obtener los aislamientos puros, las 6 cepas se sembraron a partir de glicerol (-70°C), en agar Sabouraud, las cajas fueron incubadas por 72 hrs a 22°C. Posterior al tiempo de incubación, se observó crecimiento uniforme de las unidades formadoras de colonia (UFC) en el medio de cultivo.
- **Determinación de tolerancia a la sal por la levaduras:** Del aislamiento anterior se tomó una UFC para la resiembra en agar Sabouraud con una concentración de sal de 0, 25, 50, 100 y 200 mM, estos se incubaron a 22°C por 72 hrs. Como control positivo se utilizó la bacteria *Azospirillum* debido ya que en diferentes reportes se ha demostrado que soporte alta concentraciones de sal.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluar el efecto de levaduras psicrófilas en la promoción de crecimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

En el ensayo de promoción de crecimiento se evaluaron seis levaduras aisladas del volcán Popocatepetl del estado de Puebla en México. 2 *Rhodotorula* spp (cepas R2 y R4); 3 *Mrakia* spp (M7, M8 y M9) y una levadura blanca denominada LB3.

Para evaluar el efecto de las levaduras psicrófilas sobre el crecimiento de tomate, la interacción microorganismo-planta se dejó por 30 días. Pasado este tiempo, las variables de longitud, peso fresco y seco de raíz, vástago y total fueron medidas y comparadas frente al control. Los resultados muestran que la cepa R4 tuvo un efecto positivo sobre el peso fresco y seco de vástago (992,9 y 50,5 mg respectivamente), y peso fresco y seco total (1055,4 y 57,6 mg respectivamente) (figura 3, 4, 5 y 6). El valor en porcentaje frente al peso fresco total fue de 14,6% y seco total de 18,6% frente al control. Respecto al peso fresco de raíz, las cepas R2 y R4 mostraron un efecto negativo, con valores por debajo al control que fue de 67,8 mg (figura 4). Aunque la cepa 2 tuvo un efecto positivo sobre el peso seco de raíz con valor de 8 mg, respecto al control de 7 mg (figura 6), no tuvo significancia en promoción de crecimiento de tomate.

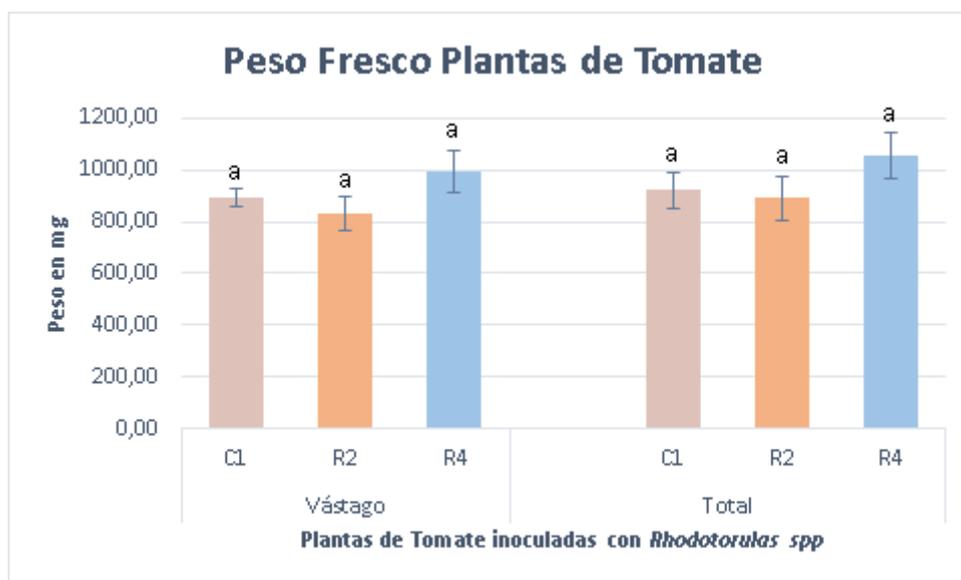


Figura 3. Peso fresco plantas de tomate inoculadas con *Rhodotorula* spp. C1=Control 1, R2=*Rhodotorula* spp. 2, R4=*Rhodotorula* spp. ($p > 0.05$)

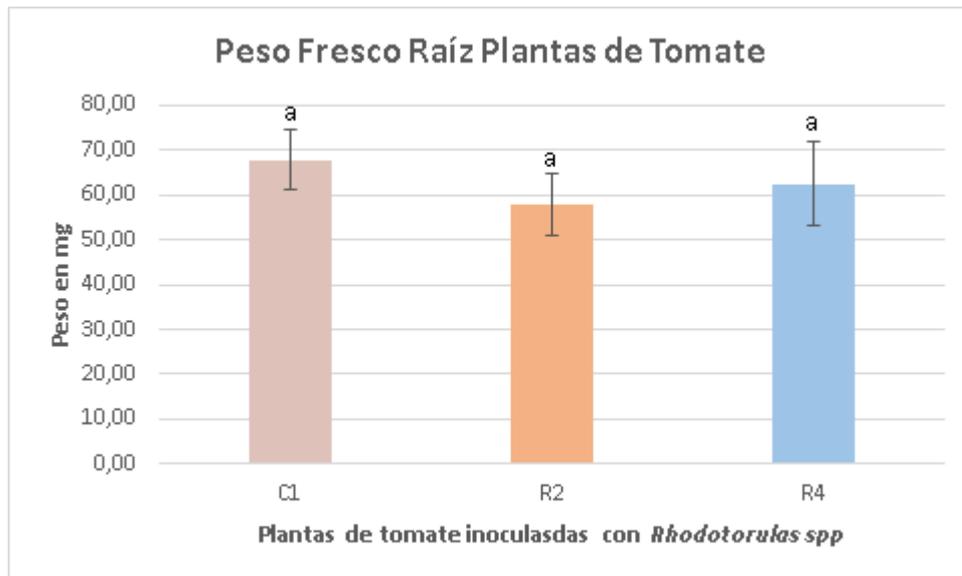


Figura 4. Peso fresco planta de tomate inoculadas con *Rhodotorulas spp*. C1=Control 1, R2=*Rhodotorula spp*. 2, R4=*Rhodotorula spp*. 4 ($p>0.05$)

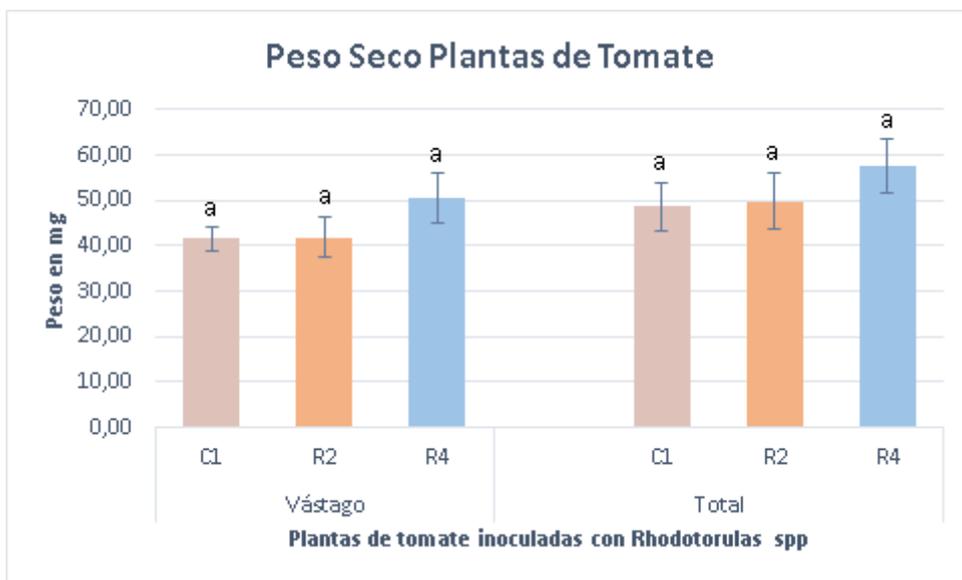


Figura 5. Peso seco planta de tomate inoculadas con *Rhodotorula spp*. C1=Control 1, R2=*Rhodotorula spp*. 2, R4=*Rhodotorula spp*. 4 ($p>0.05$)

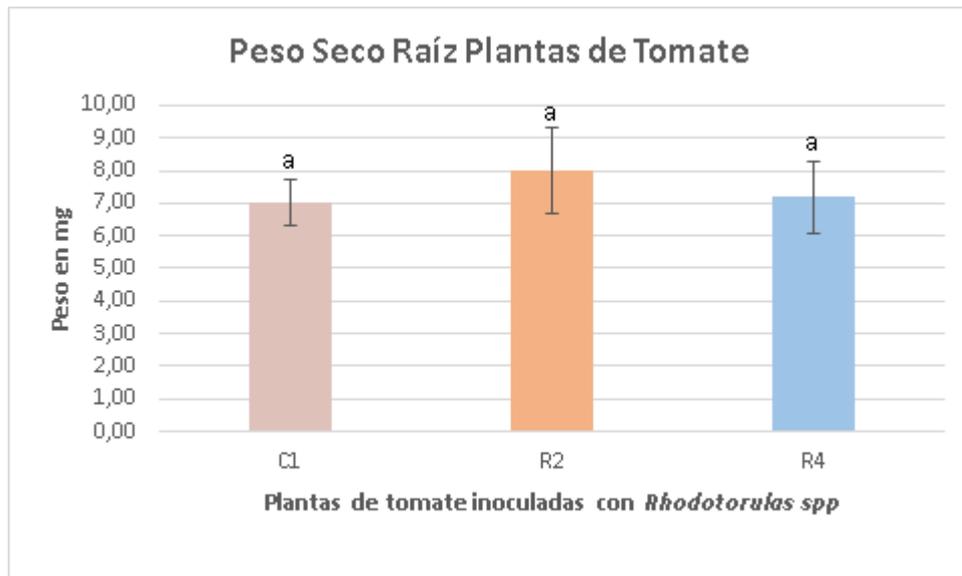


Figura 6. Peso seco raíz plantas de tomate inoculadas con *Rhodotorula* spp. C1=Control 1, R2=*Rhodotorula* spp. 2, R4=*Rhodotorula* spp. 4 ($p>0.05$)

Por otra parte, al realizar las medidas de longitud de las plantas inoculadas con *Rhodotorula* spp, se evidenció que la cepa R2 y R4 tuvieron un comportamiento similar al control, con valores en longitud de raíz, vástago y total de 7,6-21,3 y 29,0 cm para R2, 7,7-22,4 y 30,1 cm para R4 y el control 6,7, 22,7 y 29,4 cm, sin mostrar diferencias significativas entre las cepas y frente al control (figura 7 y 8).

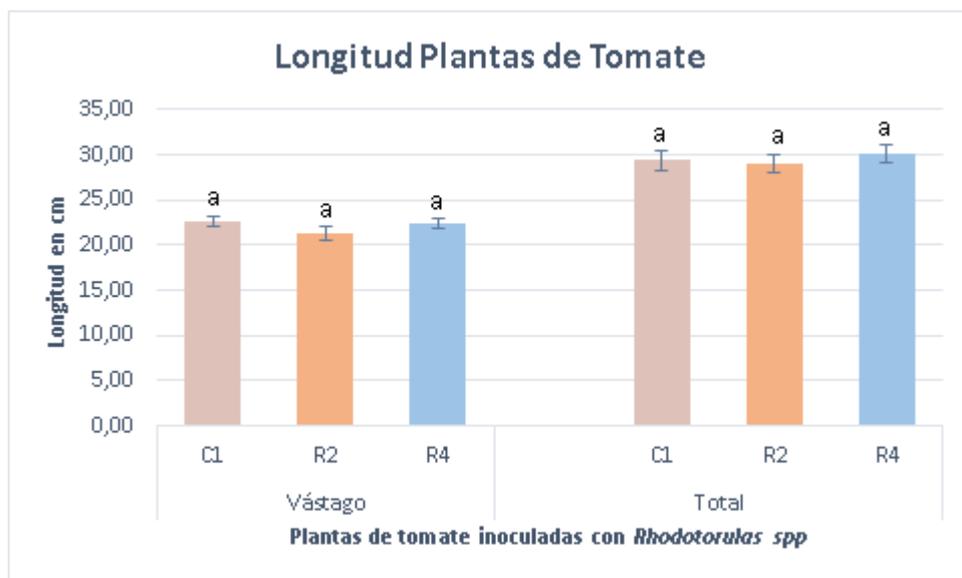


Figura 7. Longitud plantas de tomate inoculadas con *Rhodotorula* spp. C1=Control 1, R2=*Rhodotorula* spp. 2, R4=*Rhodotorula* spp. 4 ($p>0.05$)

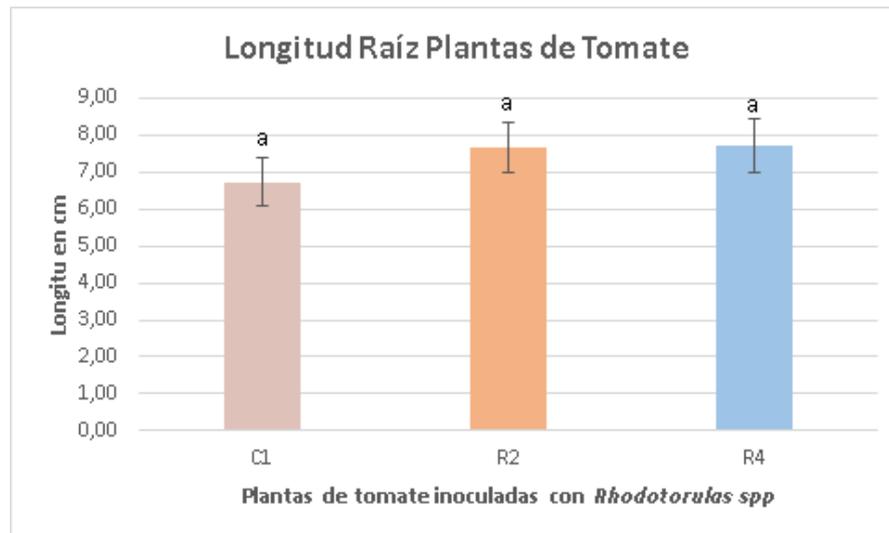


Figura 8. . Longitud raíz plantas de tomate inoculadas con *Rhodotorula* spp. C1=Control 1, R2=*Rhodotorula* spp. 2, R4=*Rhodotorula* spp. 4 ($p>0.05$)

Con respecto a las cepas de *Mrakia* spp y LB3, las cepas M7, M8 y M9, no tuvieron efecto positivo para las variables analizadas, cuyos valores estuvieron por debajo al control (figura 9 y 10), por el contrario la cepa LB3 mostró un efecto positivo con valores de 21,5, 464,0 y 485,5 mg para peso fresco de raíz, vástago y total respectivamente, comparado a 15,9, 316,8 y 332,7 mg para el control respectivamente (figura 9 y 10). La cepa LB3 mostró diferencia significativa en peso fresco de vástago y total respecto al control.

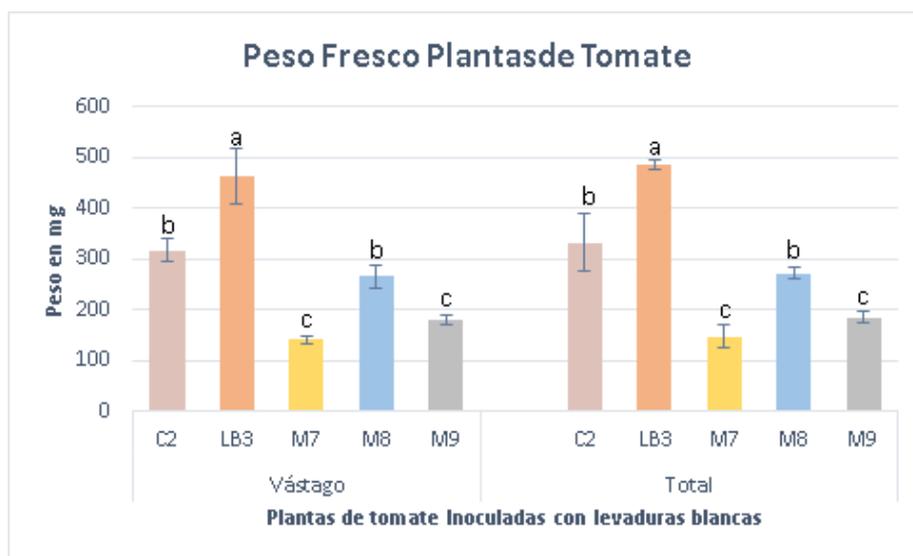


Figura 9. Peso fresco de plantas de tomate *Solanum lycopersicum* inoculadas con cepas de *Mrakia* spp., y LB3. C2= Control, planta sin inóculo, LB3= Levadura blanca 3, M7= *Mrakia* spp. 7, M8 = *Mrakia* spp. 8, M9 = *Mrakia* spp. 9. ($p>0.05$)

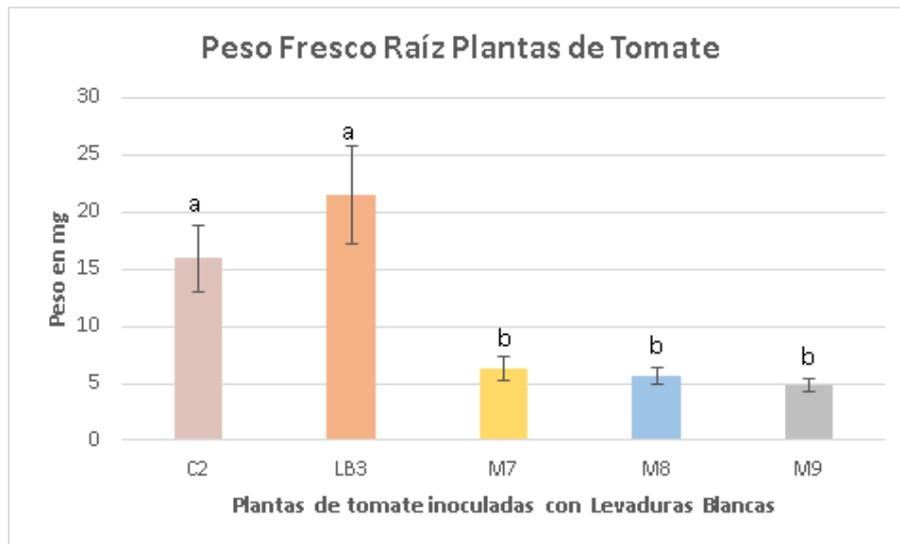


Figura 10. Peso fresco de raíz de plantas de tomate *Solanum lycopersicum* inoculadas con cepas de *Mrakia spp* y LB3. **C2**= Control, planta sin inóculo, **LB3**= Levadura blanca 3, **M7**= *Mrakia spp.*7, **M8** = *Mrakia spp.*8, **M9** = *Mrakia spp.*9. ($p>0.05$)

Por otro lado se analizó el efecto de las levaduras en el peso seco de la planta de tomate. El efecto de las levaduras sobre la variable, mostró el mismo efecto que para peso fresco. Las cepas M7, M8 y M9 mostraron valores por debajo del control para la variable analizada. LB3 mostró diferencia significativa respecto al control con valores de 28,5 y 31,8 mg para vástago y total respectivamente, frente a 17,1 y 19,1 mg para el control (figura 11). De igual forma la cepa LB3 mostró valores superiores al control para peso seco de raíz (figura 12).

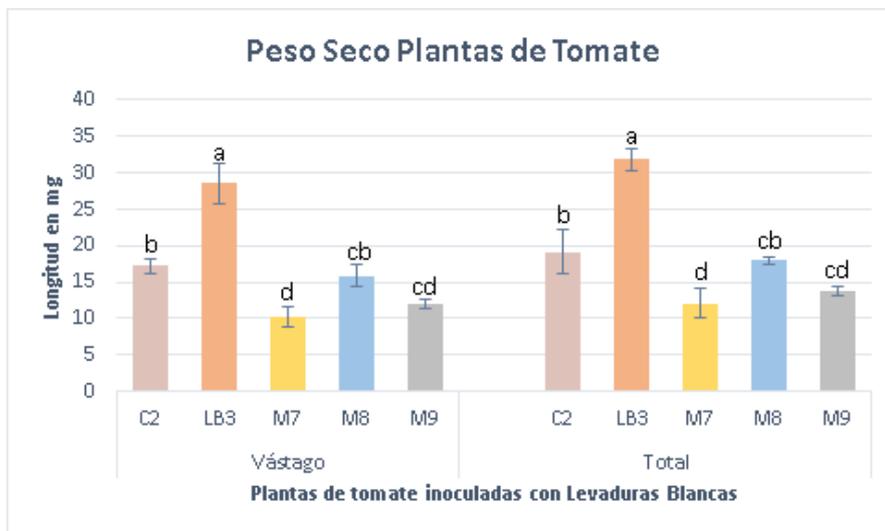


Figura 11. Peso seco de vástago y total de *Solanum lycopersicum* inoculadas con cepas de *Mrakia spp* y LB3. **C2**= Control, planta sin inóculo, **LB3**= Levadura blanca 3, **M7**= *Mrakia spp.*7, **M8** = *Mrakia spp.* 8, **M9** = *Mrakia spp.*9.

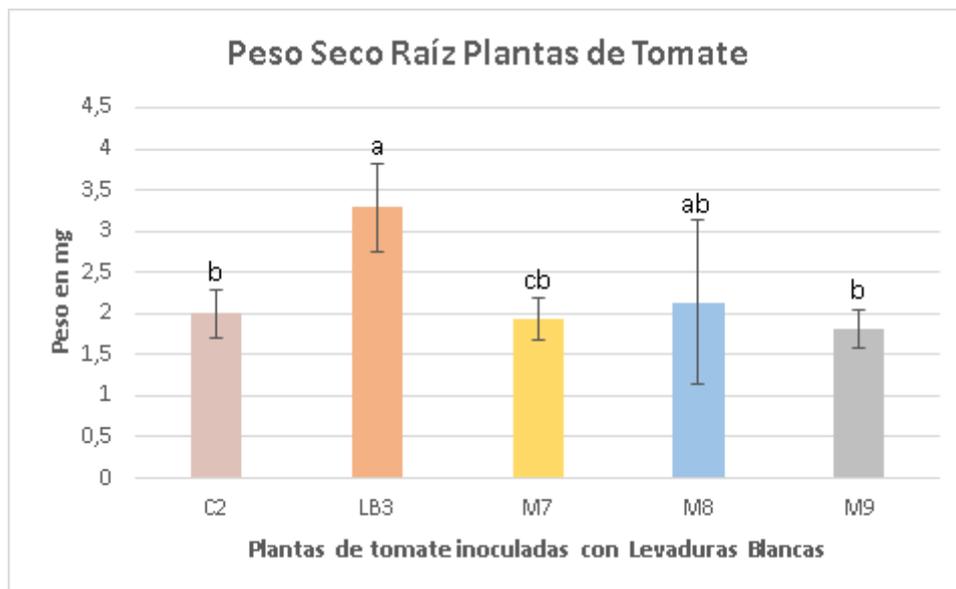


Figura 12. Peso seco de raíz de *Solanum lycopersicum* inoculadas con cepas de *Mrakia spp* y LB3. **C2**= Control, planta sin inóculo, **LB3**= Levadura blanca 3, **M7**= *Mrakia spp.* 7, **M8** = *Mrakia spp.* 8, **M9** = *Mrakia spp.* 9 ($p > 0.05$)

Con respecto a la longitud de las plantas de tomate, inoculadas con M7, M8 y M9 y LB3, ninguna cepa tuvo un efecto positivo superior al control, como se observa en la figura 13 y 14. Por lo tanto, la longitud total de las plantas de tomate inoculadas con las levaduras *Mrakia spp* y LB3 no posee una diferencia significativa con respecto al control.

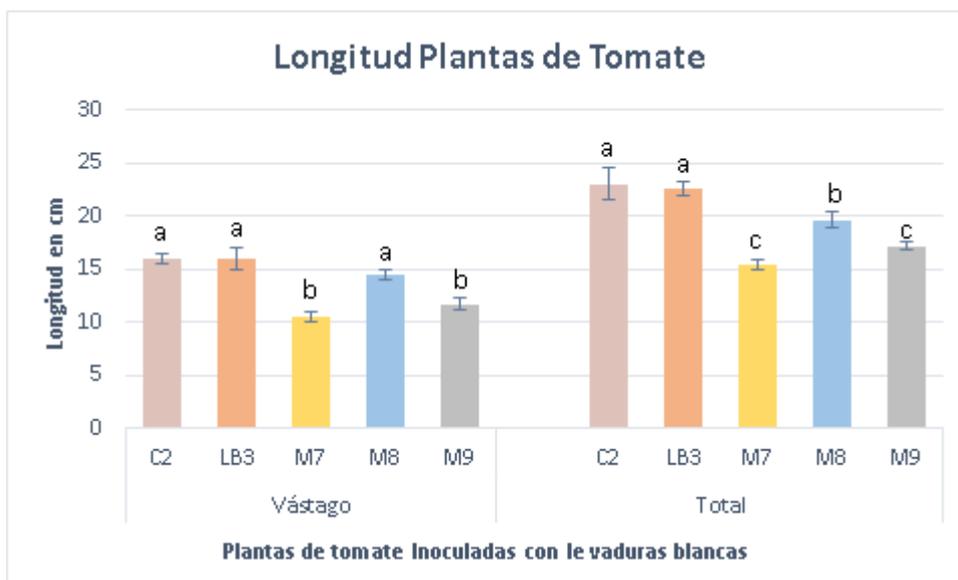


Figura 13. Longitud de las plantas *Solanum lycopersicum* inoculadas con cepas de *Mrakia spp* y LB3. **C2**= Control, planta sin inóculo, **LB3**= Levadura blanca 3, **M7**= *Mrakia spp.* 7, **M8** = *Mrakia spp.* 8, **M9** = *Mrakia spp.* 9 ($p > 0.05$)

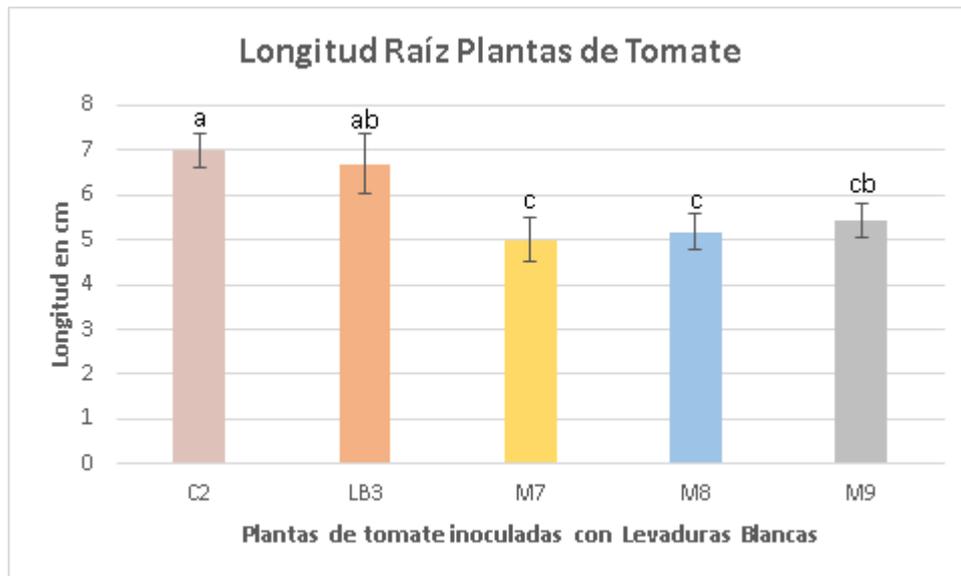


Figura 14. Longitud de la raíz de *Solanum lycopersicum* inoculadas con cepas de *Mrakia* spp y LB3. **C2**= Control, planta sin inóculo, **LB3**= Levadura blanca 3, **M7**= *Mrakia* spp. 7, **M8** = *Mrakia* spp. 8, **M9** = *Mrakia* spp. 9 ($p > 0.05$)

4.2. Caracterizar los mecanismos de acción de las levaduras psicrófilas promotoras de crecimiento en plantas de tomate.

- **Producción de AIA por levaduras psicrófilas**

Para determinar la producción de AIA por las levaduras, el ensayo fue llevado a cabo en caldo Sabouraud, durante 4 días de incubación y la cuantificación se realizó con el reactivo Salvosky. Los valores de AIA obtenidos en las levaduras se encuentran entre 0.36 (M7) y 0.067mg/L, siendo la cepa M8 la que produjo mayor concentración de AIA (0,067mg/L). Sin embargo todos los resultados estuvieron por debajo del control *Azospirillum spp* de 0.197mg/L (tabla 4). Aunque los valores estuvieron por debajo del control, es importante conocer la capacidad de estas levaduras para producir factores promotores de crecimiento vegetal.

- **Solubilización de fosfato por levaduras psicrófilas**

Para determinar la producción de solubilización de fosfatos por las levaduras, el ensayo fue llevado a cabo en medio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth médium), durante 6 días de incubación y la cuantificación a partir de sobrenadante del cultivo se realizó con el protocolo de test fosfatos (Spectroquant® Phosphate Test-Merck). Todas las levaduras tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato y el rango estuvo entre 2 a 6.9 mg/L. Las cepas con mayor fosfato soluble fueron la R4 (6,9mg/L) y M7 (4,6 mg/L), valores superiores a la cepa control PAO (2,6 mg/L) (Tabla 4).

- **Resultados producción de amonio y fijación de nitrógeno.**

La producción de amonio por las levaduras se realizó en agua peptonada como fuente de nitrógeno durante durante 6 días de incubación y la cuantificación se realizó con el protocolo (Ammonium Spectroquant Test Kits-Merck). Todas las cepas de levaduras fueron productoras de amonio, y el rango de valores estuvo entre 0,07 y 0,026 mg/L. Dichos valores estuvieron por debajo de los controles positivos, PAO (0,4 mg/L) y AZ (1,03 mg/L) (Tabla 4). La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico fue realizado en medio sólido NF, la incubación se dejó por 4 días a temperatura ambiente, pasados los 4 días se revisaron las cajas y se evidenció que no hubo crecimiento de las levaduras, por tanto no tuvieron la capacidad de fijar nitrógeno.

Los resultados de los metabolitos, demuestra la capacidad de las levaduras para producir factores de promoción de crecimiento vegetal, que podría favorecer positivamente el crecimiento de las plantas.

Tabla 4. Resultados pruebas de metabolitos en levaduras psicrófilas.

RESULTADOS PRUEBAS DE METABOLITOS					
CEPAS	MICROORGANISMO	SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS	SÍNTESIS DE AIA	PRODUCCIÓN DE AMONIO	FIJACIÓN DE NITROGENO
		CUANTI	CUANTI	CUANTI	CUALI
C-	Control negativo	-	-	-	-
PAO	<i>Pseudomona auroginosa</i>	2,6 mg/L	N/A	0,4 mg/L	NEG
AZ	<i>Azospirillum spp.</i>	N/A	0,197 mg/L	1,03 mg/L	POS
R2	<i>Rhodotorula spp.</i>	3,5 mg/L	0,058 mg/L	0,16 mg/L	NEG
R4		6,9 mg/L	0,042 mg/L	0,19 mg/L	NEG
L3		2,3 mg/L	0,039 mg/L	0,07 mg/L	NEG
M7	<i>Makria spp.</i>	4,6 mg/L	0,036 mg/L	0,26 mg/L	NEG
M8		2 mg/L	0,067 mg/L	0,19 mg/L	NEG
M9		2,3 mg/L	0,064 mg/L	0,21 mg/L	NEG
CUANTI= Cuantitativo, CUALI=Cualitativo, N/A= No aplica, POS=Positivo, NEG= Negativo					

4.3. Evaluar la tolerancia de las levaduras psicrófilas a diferentes concentraciones salinas.

Para evaluar la tolerancia de las levaduras a estrés salino, cada cepa se cultivó en medio Sabouraud con diferente concentración de sal (0, 25, 50, 100 y 200 mM de NaCl). Como control se utilizó *Azospirillum* spp, Los resultados muestran que todas las cepas de levaduras, incluido el control crecieron en todas las concentraciones de sal probadas, observándose un crecimiento menor a 200 mM de NaCl (Anexo 17).

5. DISCUSIÓN

Las levaduras psicrófilas son microorganismos que han colonizado ambientes fríos de la biosfera, estos microorganismos desempeñan funciones ecológicas claves en su hábitat.

Una de las facultades que tienen los hongos y las bacterias es la promoción de crecimiento vegetal, por lo tanto en los últimos años se han usado por la biotecnología, con el fin de reemplazar sustancias químicas que alteran varios ecosistemas. Thomas-Hall et al. 2010, refiere en su estudio que los microorganismos psicrófilos tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos a bajas temperaturas, e influyen de manera importante en el ecosistema vegetal en ambientes fríos. En este trabajo se evaluaron seis levaduras psicrófilas aisladas del volcán nevado de Toluca en México, y dos controles positivos *P. aeruginosa* y *Azospirillum* spp., para determinar su capacidad para promover el crecimiento de tomate, y determinar si el crecimiento de plantas pueden estar relacionado a la producción de factores o metabolitos. El crecimiento está definido como un incremento irreversible en las dimensiones de las plantas, este crecimiento es evidenciado por la acumulación de peso ya sea fresco o seco, las variaciones en altura o diámetro, o los cambios en el área foliar (58).

En el ensayo de promoción de crecimiento en invernadero se logró observar que la cepa LB3 (16,6%) (Peso fresco de 56,7, peso seco 3,1) no produjo un efecto significativo sobre la promoción de crecimiento, con un $p < 0.05$ con respecto a las 6 cepas estudiadas. Para valorar el efecto sobre el crecimiento de tomate por parte de LB3, se relacionó con la producción de factores o algunos mecanismos de acción de microorganismos sobre plantas, y se compararon los resultados de las demás levaduras. Los mecanismos analizados fueron la producción de AIA, amonio y solubilización de fosfatos, además de fijación de nitrógeno atmosférico. El resultado en cuanto a estos metabolitos en la levadura psicrófila LB3 fueron 0.039mg/L, 0.07mg/L, 2,3 mg/L y negativo respectivamente. Frente al control positivo *Azospirillum* spp, los datos de LB3 estuvieron por debajo para las variables mencionadas (tabla 4)(Anexo 11). Dichos resultados se comparan con el estudio realizado por Yarzabal A. en el 2014, quien estudió la promoción de crecimiento por levaduras psicrófilas y encontró que aquellas levaduras estudiadas solo promovían el crecimiento a temperaturas inferiores a 16°C, por lo que se puede inferir que LB3 puede llegar a ser parte de este grupo (59). Por otro lado, los resultados de mecanismos de acción de LB3 (Figura 9-14) (Anexo 7) no fueron representativos con relación al control positivo, este fenómeno se pudo haber dado ya que LB3 puede utilizar otros mecanismos de acción como sideróforos u otras auxinas tales como las citoquinas o giberlinas, los cuales no fueron analizados en esta investigación.

Con relación a las *Rhodotorula* spp., se logró determinar que R4 fue la que mejor resultados mostró en la evaluación de solubilización de fosfatos, esta levadura produjo 6.9 mg/L, mientras R2 3.5 mg/L y el control positivo *P. aeruginosa* produjo 2.6 mg/L (Tabla 4), a pesar de estos resultados, en el estudio de promoción de crecimiento, no se encontró diferencia significativa de R4 con respecto a R2 y el control sin inóculo (Figura 3-8). Estos resultados se relacionan con el estudio realizado por Silambarasan et al. 2018, los cuales estudiaron diferentes microorganismos con el fin de analizar diversos factores entre ellos la promoción de crecimiento, en donde encontraron que la cepa de *Rhodotorula* spp. CAH2, poseía la capacidad de promover el crecimiento de la planta de tomate *Solanum Lycopersicum*, gracias a su producción de biomoléculas tales como fósforo, AIA y sideróforos (60). Por otra parte teniendo en cuenta que R4 fue la mejor solubilizadora de fosfatos, el cual es un elemento esencial para las plantas, debido a que el fosforo es un elemento fundamental en la fotosíntesis, la respiración celular, y necesario para el desarrollo de estructuras reproductivas,

esto también fue estudiado por Sánchez et al. 2005, en donde estudiaron microorganismos aislados de un páramo y los compararon con respecto a otros que se conocen sus capacidades solubilizadoras de fosfato y productoras de AIA, con el fin de determinar si aquellos que tenía los dos factores de crecimiento nombrados anteriormente tenían la capacidad de promover el crecimiento, a comparación de aquellos que solo poseían una de las dos. Quienes concluyeron que efectivamente los microorganismos entre ellos *Rhodotorula* spp., la cual cumplía las dos funciones, era capaz de promover mejor el crecimiento de la planta de tomate *Solanum lycopersicum*.(61) Este estudio se correlaciona con el realizado en este trabajo ya que a pesar de que R4 fue la mayor solubilizadora de fosfato (6.9 mg/L), no fue la mayor promotora de crecimiento, esto se pudo deber a que su síntesis de AIA no fue tan significativa, lo cual fue analizado en el trabajo mencionado anteriormente.

Así mismo se evidenció que los microorganismos que se estudiaron tienen la capacidad de producir amonio en cantidades más bajas respecto al control positivo y no fijaron nitrógeno, el cual ha sido solo identificado en especies de bacterias (Tabla 4), esto se debe a que genéticamente las levaduras no poseen un gen específico que cumpla la fijación de nitrógeno, aunque en algunas levaduras a nivel de su genoma, se ha evidenciado la presencia de genes con alta homología a los de bacterias fijadoras de nitrógeno, pero que en levaduras tienen funciones en la síntesis de metaloproteínas (62).

Por otro lado se conoce que los fertilizantes químicos tienden a degradar los suelos y a conferirles grandes cantidades de sal que no permiten el crecimiento óptimo de las plantas, considerándose éste un factor crítico para la productividad de los cultivos. Es por eso que se han estudiado microorganismos que sean capaces de crecer en diferentes concentraciones de sal y que al mismo tiempo puedan producir metabolitos que son capaces de estimular el crecimiento vegetal.

En nuestro estudio se puede observar que todas las levaduras crecieron a las diferentes concentraciones de NaCl evaluadas. La capacidad de crecer en altas concentraciones de sal, se relaciona con el estudio realizado por Ahangangoda et al. 2019, quienes estudiaron especies de *Saccharomyces* spp. que son capaces de crecer en medios de cultivo YPD con unas concentraciones salinas de (5.0, 7.5, 10.0%). (63).

Además Silambarasan et al., 2018, demostraron la capacidad de la levadura *Rhodotorula* spp. CAH2, para producir exopolisacáridos los cuales le dan la capacidad de crecer en 150 mM de NaCl, solubilizar fosfatos, producir AIA, sideróforos y enzima ACC desaminasa, confiriendo capacidades de promoción de crecimiento vegetal a esta levadura (60).

Finalmente este estudio se correlaciona con el estudio realizado por Gonzales J., et al, 2002 en donde determinaron aquellos microorganismos que tienen la capacidad de crecer en ambientes con concentraciones desde 0.2 mM, los cuales son considerados como microorganismos ligeramente halófilos (64) en el caso de las levaduras psicrófilas de este estudio que crecieron a una concentración salina de 200 mM se podrían considerar como microorganismos ligeramente halófilas, lo que significa que cuentan con estrategias de adaptación que les permiten crecer en este estrés osmótico manteniendo altas concentraciones intracelulares de sal y sintetizan solutos compatibles que les permiten balancear su presión osmótica.

6. CONCLUSIONES

- De las 6 levaduras psicrófilas que fueron estudiadas, la LB3 produjo valores significativos en peso fresco, vástago y total frente al control negativo.
- Todas las levaduras psicrófilas que se estudiaron, tuvieron la capacidad de producir metabolitos promotores de crecimiento vegetal como AIA y solubilización de fosfatos, lo que indica que puede ser usadas como biofertilizantes en el suelo.
- A pesar que todas las levaduras mostraron la capacidad de producir factores de promoción de crecimiento vegetal, ninguna de ellas promovió el crecimiento de tomate en las condiciones evaluadas.
- Las levaduras psicrófilas estudiadas poseen la capacidad de tolerar diferentes concentraciones de sal, lo que las hace microorganismos potenciales para el uso en suelos con altas concentraciones de sal.

7. RECOMENDACIONES

En base a los resultados y conclusiones obtenidos se recomienda realizar investigaciones en donde se pueda determinar la capacidad de las levaduras analizadas en la mitigación del estrés salino bajo condiciones de invernadero

Se sugiere que al realizar próximos proyectos las condiciones de invernadero estén controladas, debido a que esto puede alterar los resultados tales como alta mortalidad en las plantas y el crecimiento de las mismas.

Una vez concluido el presente trabajo se pone a consideración de la comunidad educativa investigar sobre otros mecanismos de acción que puedan poseer estas levaduras y su concentración sea más alta que las de los analizados en este proyecto.

8. REFERENCIAS

1. Organización de las naciones unidas para alimentación y agricultura. FAOSTAT [Internet]. [cited 2019 Sep 10]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
2. Cardona AO. Agronegocios [Internet]. ANTIOQUIA Y NORTE DE SANTANDER SON LOS DEPARTAMENTOS LÍDERES EN LA PRODUCCIÓN DE TOMATE. 2018 [cited 2019 Sep 10]. Available from: <https://www.agronegocios.co/agricultura/cuales-son-las-regiones-que-mas-producen-tomate-2728689>
3. IDEAM. MAPA NACIONAL DE DEGRADACION DE SUELOS POR SALINIZACIÓN [Internet]. IDEAM. Colombia; 2017. Available from: <http://www.ideam.gov.co/documents/24277/69989379/Lanzamiento+mapa+Salinizacion+FN+OPT.pdf/624515d0-799d-41ef-b1ef-bb7e868680f3>
4. Yan N, Marschner P, Cao W, Zuo C, Qin W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *Int Soil Water Conserv Res* [Internet]. 2015;3(4):316–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>
5. Lamz Piedra A, Gonzalez Cepero MC. Revisión bibliográfica LA SALINIDAD COMO PROBLEMA EN LA AGRICULTURA : Review Salinity as a problem in agriculture : plant breeding an immediate solution Alexis Lamz Piedra y María C . González Cepero. 2013;34(4):31–42. Available from: <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar03/HTML/articulo06.htm>
6. Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Rev Fitotec Mex* [Internet]. 2012;35(1):9–21. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000100004
7. Restrepo Correa SP, Pineda Meneses EC, Ríos Osorio LA. Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: Una revisión sistemática. *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu* [Internet]. 2017;18(2):335–51. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n2/0122-8706-ccta-18-02-00335.pdf>
8. Lara C, Oviedo LE, Betancur CA. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootec Trop* [Internet]. 2011;29(2):187–94. Available from: <http://www.bioline.org.br/pdf?zt11016>
9. Balcazar W, Rondón J, Rengifo M, Ball MM, Melfo A, Gómez W, et al. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiol Res* [Internet]. 2015;177:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.001>
10. Deegenars ML, Watson K. Heat shock response in psychrophilic and psychrotrophic yeast from Antarctica. *Extremophiles* [Internet]. 1998;2(1):41–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007920050041>

11. Larran S, Mónaco C, Alippi HE. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* mill. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2001;17(2):181–4. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1016670000288>
12. Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 2005;42(2):97–108. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-005-0008-y>
13. Peña HB, Reyes I. Nitrogen fixing bacteria and phosphate solubilizers isolated in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and evaluated as plant growth promoters | Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de. *Interciencia* [Internet]. 2007;32(8). Available from: https://www.researchgate.net/publication/239601784_Nitrogen_fixing_bacteria_and_phosphate_solubilizers_isolated_in_lettuce_Lactuca_sativa_L_and_evaluated_as_plant_growth_promoters
14. Sun PF, Fang WT, Shin LY, Wei JY, Fu SF, Chou JY. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(12):1–22. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114196>
15. Asari S, Tarkowská D, Rolčík J, Novák O, Palmero DV, Bejai S, et al. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* [Internet]. 2017;245(1):15–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5226999/>
16. Ibor P, Molina S, Núñez R, Zamarreño ÁM, García-Mina JM, Ruiz-Lozano JM, et al. Tomato ethylene sensitivity determines interaction with plant growth-promoting bacteria. *Ann Bot* [Internet]. 2017;120(1):101–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5737082/>
17. Trindade RC, Resende MA, Silva CM, Rosa CA. Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps. *Syst Appl Microbiol* [Internet]. 2002;25(2002):294–300. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202004701150>
18. Nakagawa T, Nagaoka T, Taniguchi S, Miyaji T, Tomizuka N. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2004;38(5):383–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2004.01503.x?sid=nlm%3Apubmed>
19. Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol* [Internet]. 2011;162(3):346–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250810002810>
20. Thomas-Hall SR, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B, et al. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles* [Internet]. 2010;14(1):47–59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797416/>
21. Jiang F, Zheng X, Chen J. Microarray analysis of gene expression profile induced by the biocontrol yeast *Cryptococcus laurentii* in cherry tomato fruit. *Gene* [Internet].

- 2009;430(1–2):12–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.09.036>
22. Duarte AWF, Passarini MRZ, Delforno TP, Pellizzari FM, Cipro CVZ, Montone RC, et al. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2016;8(5):874–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1758-2229.12452>
 23. Limtong S, Kaewwichian R, Yongmanitchai W, Kawasaki H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014;30(6):1785–96. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-014-1602-7>
 24. Saha C, Seal A. Early changes in shoot transcriptome of rice in response to *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1. *Genomics Data* [Internet]. 2015;6:237–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4664776/>
 25. Vásquez C JA, Ramirez Castrillón M, Monsalve F ZI. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2016;18(2):129. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/61530/58120>
 26. Karlidag H, Yildirim E, Turan M, Pehlivan M, Donmez F. Plant growth-promoting rhizobacteria mitigate deleterious effects of salt stress on strawberry plants (*Fragaria* × *ananassa*). *HortScience* [Internet]. 2013;48(5):563–7. Available from: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/48/5/article-p563.xml>
 27. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas AL, Hidalgo-díaz L. Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. 2014;29(2):122–7. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000200007
 28. Vallejo Cabrera FA. Mejoramiento genético y la producción de tomate en Colombia [Internet]. 1°. Zúñiga JE, Morera MG de, editors. Universidad nacional de Colombia. Cali, Colombia: Feriva S.A.; 1999. 1–74 p. Available from: http://bdigital.unal.edu.co/46245/6/9588095026_Part01.PDF
 29. Pérez J, Hurtado G, Aparicio V, Argueta Q, Larín MA. Guía Técnica CULTIVO DE Tomate [Internet]. Centro Nacional De Tecnología Agropecuariay Forestal. San Salvador, El Salvador: CENTA; 2003. 1–48 p. Available from: <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia Tomate.pdf>
 30. Axayacatl O. Fases de desarrollo o etapas fenológicas del cultivo del tomate [Internet]. [cited 2019 Sep 12]. Available from: <https://blogagricultura.com/etapas-fenologicas-tomate/>
 31. Escobar H, Lee R. Manual de producción de tomate bajo invernadero [Internet]. Vol. 1, Manual de producción de tomate bajo invernadero. 2009. 180 p. Available from: https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/publication/field_attached_file/pdf-manual_produccion_de_tomate_-_pag.-_web-11-15.pdf
 32. López Sánchez J. Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal. 2017;291.
 33. Peralta IE, Spooner dm. granule-bound starch synthase (gbssi) gene phylogeny of

- wild tomatoes (*Solanum* l. section *lycopersicon* [mill.] wettst. subsection *lycopersicon*). *Genetics*. 2001;88(10):1888–902.
34. Salud y Buenos Alimentos. Clasificación y propiedades del Tomate (*Solanum lycopersicum*) [Internet]. [cited 2019 Sep 14]. Available from: <http://saludybuenosalimentos.es/alimentos/index.php?s1=Verduras%2FHortalizas&s2=Frutos&s3=Tomate>
 35. Reino Vegetal. ¿Cuáles son las partes de una planta? [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 14]. Available from: <http://reinovegetal.net/partes-de-una-planta>
 36. López L. Manual técnico del cultivo de tomate [Internet]. 2017. 63–93 p. Available from: <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/3143/1/BVE17079148e.pdf>
 37. Espinoza G. Tomate, *Solanum lycopersicum*, características de la planta y fruto [Internet]. 07/07/2019. 2019 [cited 2019 Sep 14]. Available from: <https://invertebrados.paradais-sphynx.com/artropodos/insectos-clasificacion-caracteristicas.htm>
 38. INFOAGRO. El cultivo del tomate (Parte I) [Internet]. [cited 2019 Sep 14]. Available from: https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate__parte_i_.asp
 39. Cámara de Comercio de Bogotá CCB. Manual Tomate. In: Programa De Apoyo Agrícola Y Agroindustrial Vicepresidencia De Fortalecimiento Empresarial Cámara De Comercio De Bogotá [Internet]. 2015. p. 1–56. Available from: <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14307/Tomate.pdf?s>
 40. Montoya Valencia CG. Origen Tomate. 2017;80. Available from: https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/14771/1/César_Gerardo_Montoya_Valencia.pdf
 41. INFOAGRO. Agroinformación - El cultivo del tomate. 3ª parte. [Internet]. [cited 2019 Sep 11]. Available from: <https://www.infoagro.com/hortalizas/tomate3.htm>
 42. Salazar Estrada IG, Galeano Ramírez MC. MICROLOGIA GENERAL [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 14]. Available from: <http://www.ucm.edu.co/centro-editorial/>
 43. Prescott L, Harley J, Klein D. MICROBIOLOGY. fourth edi. Kane K, Smith J, editors. Estados unidos: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 1999. 522–530 p.
 44. Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM. Cold and hot extremozymes: Industrial relevance and current trends. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2015;3(OCT). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4611823/pdf/fbioe-03-00148.pdf>
 45. Dalmaso GZL, Ferreira D, Vermelho AB. Marine extremophiles a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs* [Internet]. 2015;13(4):1925–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413194/pdf/marinedrugs-13-01925.pdf>
 46. Tsuji M. Cold-stress responses in the antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2016;3(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968460/>

47. Chauhan A, Bharti PK, Goyal P, Varma A, Jindal T. Psychrophilic pseudomonas in antarctic freshwater lake at stornes peninsula, larsemann hills over east Antarctica. Springerplus [Internet]. 2015;4(1):0–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4627980/>
48. Castagno LN, Estrella MJ, Sannazzaro AI, Grassano AE, Ruiz OA. 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 [Internet]. 2011;110(5):1151–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x>
49. Patiño Torres CO, Sanclemente Reyes OE. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. ENTRAMADO [Internet]. 2014;10(2):288–97. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265433711018>
50. Beltrán Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu [Internet]. 2015;15(1):101. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf>
51. Vyas P, Gulati A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. BMC Microbiol [Internet]. 2009;9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2738680/>
52. Loredó OC, López RL, Espinosa VD. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Graminaceous Species: A Review. TERRA Latinoam [Internet]. 2004;22(2):225–39. Available from: [researchgate.net/publication/258219164_Plant_Growth-Promoting_Bacteria_in_Association_with_Graminaceous_Species_A_Review](https://www.researchgate.net/publication/258219164_Plant_Growth-Promoting_Bacteria_in_Association_with_Graminaceous_Species_A_Review)
53. Azcón-Bieto J, Talón M. Fundamentos de Fisiología Vegetal [Internet]. SEGUNDA. Florensa A, editor. McGraw-Hill; 2008. Available from: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon..pdf>
54. Prado A. Optimización de la producción de AIA por bacterias promotoras de crecimiento y evaluación de su efectividad biológica en papa (*Solanum tuberosum* var. Alpha). 2013;93. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/534/62681s.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
55. D.K. Malik and S.S. Sindhu. Transposon-derived mutants of *Pseudomonas* strains altered in indole acetic acid production: Effect on nodulation and plant growth in green gram (*Vigna radiata* L.). Springer [Internet]. 2008;14(4). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12298-008-0029-8>
56. Zedong Tenga, Wen Shao, Keyao Zhanga, Yaoqiang Huo, Min Lia. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. Science [Internet]. 2018;231 (189-197). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147971831140X?via%3DiHu>

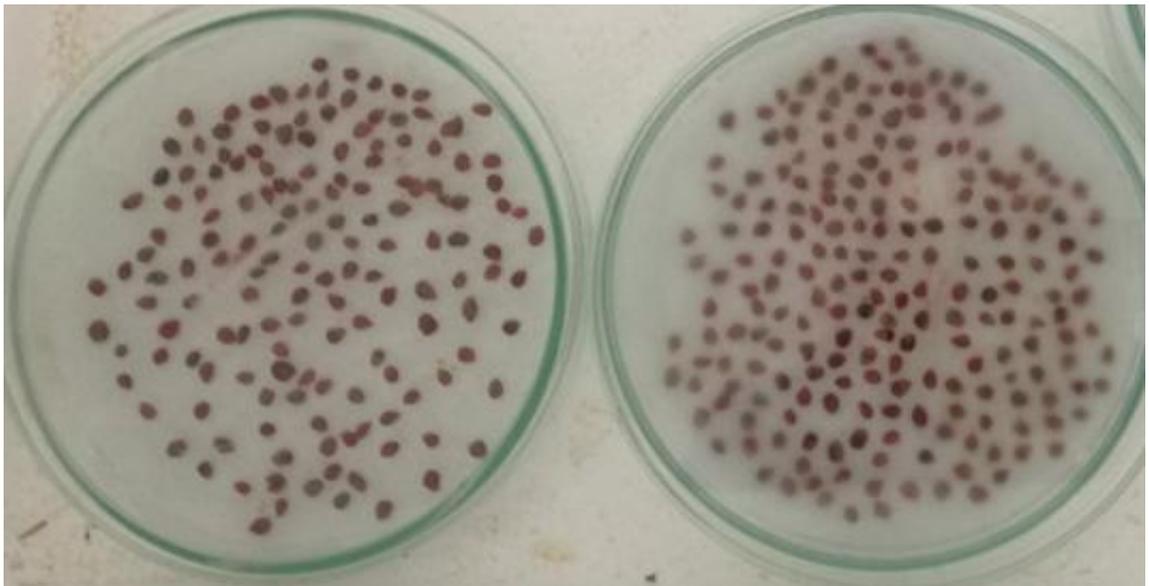
[b](#)

57. Medhin H. Kifle and Mark D. Laing. Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. *Front. Plant Sci.* [Internet]. 2016;6(1225). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01225/full>
58. Castellanos MS, Segura AM, Núñez López CE. Análisis de Crecimiento y Relación Fuente-Demanda de Cuatro Variedades de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Scielo* [Internet]. 2010;63(1):5253–66. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n1/a04v63n01.pdf>
59. Yarzabal A., Cold-Tolerant Phosphate-Solubilizing Microorganisms and Agriculture Development in Mountainous Regions of the World. Springer International Publishing Switzerland [Internet]. 2014;113-135. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-08216-5_5#citeas
60. Silambarasan S, Logeswari P, Cornejo P, Kannan VR. Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;121:55–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016>
61. Sánchez J, Valencia H, Valero O. Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo El Granizo. In 2005. Available from: http://bdigital.unal.edu.co/47915/3/9587014812_Part02.PDF
62. Brown T. Anotación de la secuencia del genoma de levadura. In: *Genomas*. 2007. p. 162 y 163.
63. Ahangangoda Arachchige MS, Yoshida S, Toyama H. Thermo-and salt-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting coconut toddy from Sri Lanka. *Biotechnol Biotechnol Equip* [Internet]. 2019;0(0):1–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2019.1631213?fbclid=IwAR0TLZMoZnmHv7dp5SQCxKUYtTINFIZ4RN5SZk7tTkKXp2rRcNnmMj--hRM&#aHR0cHM6Ly93d3cudGFuZGZvbmxpbmUuY29tL2RvaS9wZGYvMTAuMTA4MC8xMzEwMjg4OC4yMDE5LjE2MzEyMTM/bmVIZEFjY2Vzc210cnVlQEBAMA==>
64. González-hernández JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol*. 2002;44(3–4):137–56.

9. ANEXOS

ANEXO 1. 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. Realiza previa desinfección con hipoclorito de sodio al 5% por 3 minutos
4. Realizar tres lavados con agua destilada estéril.
5. Realizar un lavado con alcohol al 70% durante un minuto.
6. Realizar de nuevo tres lavados con agua destilada estéril.
7. Dejar las semillas toda la noche en una caja petri con una toalla absorbente y agua.



ANEXO 2. Solución Nutritiva Hoagland

FUNDAMENTO

La solución de Hoagland es una solución nutritiva hidropónica publicado por Hoagland y Arnón en 1938 y revisado por Arnón en 1950. Esta solución fue de las primeras desarrollada para el cultivo de plantas sin suelo / sustrato. La solución de Hoagland proporciona todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y es apropiado para una amplia gama de especies de plantas.

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 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15g/L	5	Ca	200,4
4	1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246g/L	2	Mg	24,305
7	EDTA de hierro		1	Fe	
	Micro elementos				
8	H_3BO_3	2.86g/L	1	B	
9	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81g/L		Cl	
8	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22g/L		Zn	
9	CuSO_4	0.080g/L		Cu	
10	$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.020g/L		Mo	
11	Agua para completar 1L		985	Mn	

ANEXO 3. Siembra de semillas en germinadores.



ANEXO 4. Plántulas de Tomate dos semanas después de germinación.



ANEXO 5. Plántulas de tomate después de haberlas trasplantado.



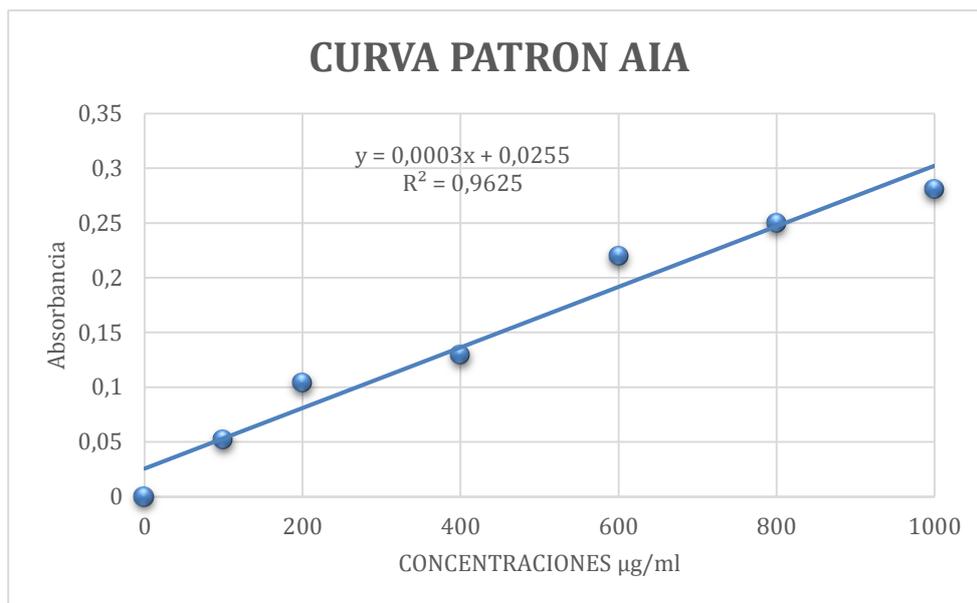
ANEXO 6. Plantas recolectadas post 30 días de interacción con levaduras.

CEPA	POSIBLE MICROORGANISMO	Morfología de las plantas
------	------------------------	---------------------------

<p>C-</p>	<p>PLANTA SIN INOCULO</p>	
<p>R2</p>	<p><i>Rhodotorula</i> spp</p>	
<p>R4</p>		
<p>LB3</p>	<p>Levadura blanca</p>	
<p>LB7</p>	<p><i>Mrakia</i> spp.</p>	

LB8		
LB9	<i>Cryptococcus</i> spp.	

Anexo 7. Curva de calibración AIA



Anexo 8. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Control.

Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
Cepa	longitud raíz	logitud vástago	longitud planta	peso fresco raíz	peso fresco vástago	peso fresco total	peso seco raíz	peso seco vástago	peso seco total
Control									
1	4	26	30	0,041	1,037	1,078	0,003	0,047	0,05
2	8	21,5	29,5	0,071	0,92	0,991	0,007	0,05	0,057
3	6	22	28	0,08	0,84	0,92	0,007	0,043	0,05
4	8	19	27	0,065	0,58	0,645	0,007	0,023	0,03
5	3,5	20,5	24	0,046	0,708	0,754	0,007	0,029	0,036
6	13	21,5	34,5	0,113	0,787	0,9	0,007	0,041	0,048
7	3,7	23,3	27	0,088	0,994	1,082	0,003	0,035	0,038
8	11	23,5	34,5	0,044	0,924	0,968	0,009	0,036	0,045
9	6,5	24,5	31	0,051	1	0,52	0,006	0,046	0,052
10	7	21	28	0,04	0,781	0,821	0,005	0,05	0,055
11	9	21	30	0,123	1,086	1,209	0,01	0,053	0,063
12	6,7	24,1	30,8	0,06	0,951	1,011	0,008	0,022	0,03
13	4	27	31	0,066	1,077	1,143	0,006	0,057	0,063
14	5	22,5	27,5	0,046	0,843	0,889	0,006	0,04	0,046
15	6,2	22,8	29	0,107	0,832	0,939	0,015	0,05	0,065
16	6	23	29	0,045	0,809	0,854	0,006	0,044	0,05

ANEXO 9. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Rhodotorula 2.

Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
Cepa	longitud raíz	logitud vástago	longitud planta	peso fresco raíz	peso fresco vástago	peso fresco total	peso seco raíz	peso seco vástago	peso seco total
Rhodotorula 2									
1	5,7	21	26,7	0,031	0,643	0,674	0,004	0,033	0,037
2	10,5	20,5	31	0,051	0,739	0,79	0,011	0,032	0,043
3	13,3	19,7	33	0,103	1,145	1,248	0,012	0,062	0,074
4	5,5	16,5	22	0,028	0,521	0,549	0,006	0,028	0,034
5	5,2	23,8	29	0,027	0,499	0,526	0,003	0,021	0,024
6	6,5	17	23,5	0,049	0,86	0,909	0,02	0,057	0,077
7	4,5	20,5	25	0,062	0,708	0,77	0,001	0,029	0,03
8	6,5	19,2	25,7	0,075	0,688	0,763	0,009	0,034	0,043
9	8,7	24,8	33,5	0,06	1,193	1,253	0,005	0,069	0,074
10	7	22,8	29,8	0,041	0,688	0,729	0,007	0,032	0,037
11	13	24,6	37,6	0,12	1,364	1,484	0,019	0,081	0,1
12	10,5	24,2	34,7	0,08	1,024	1,104	0,008	0,031	0,039
13	4,6	24,3	28,9	0,055	1,026	1,081	0,008	0,049	0,057
14	7,7	21,7	29,4	0,069	0,902	0,971	0,007	0,043	0,05
15	6,5	25	31,5	0,052	0,875	0,927	0,004	0,046	0,05
16	7	16,4	23,4	0,024	0,424	0,448	0,004	0,024	0,028

ANEXO 10. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Rhodotorula 4.

Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
Cepa	longitud raíz	logitud vástago	longitud planta	peso fresco raíz	peso fresco vástago	peso fresco total	peso seco raíz	peso seco vástago	peso seco total
Rhodotorula 4									
1	7,7	23,5	31,2	0,069	1,016	1,085	0,007	0,017	0,024
2	5,7	22,3	28	0,074	0,814	0,888	0,007	0,037	0,044
3	8	25	33	0,064	1,074	1,138	0,005	0,054	0,059
4	4	21,5	25,5	0,046	0,856	0,902	0,004	0,047	0,051
5	14,5	23,2	37,7	0,104	1,167	1,271	0,012	0,069	0,081
6	6	18,8	24,8	0,039	0,709	0,748	0,006	0,03	0,036
7	6,5	19,9	26,4	0,017	0,676	0,693	0,005	0,032	0,037
8	12	23	35	0,093	1,091	1,184	0,009	0,057	0,066
9	6	19,5	25,5	0,057	0,807	0,864	0,006	0,045	0,051
10	5,5	26,3	31,8	0,069	1,332	1,401	0,01	0,07	0,08
11	6,5	20,9	27,4	0,043	0,859	0,902	0,006	0,05	0,056
12	7,5	25	32,5	0,066	1,271	1,337	0,014	0,043	0,057
13	8,2	20,3	28,5	0,047	0,633	0,68	0,001	0,037	0,038
14	4,5	23,5	28	0,015	0,969	0,984	0,005	0,05	0,055
15	11,6	26,4	38	0,169	1,857	2,026	0,017	0,112	0,129
16	9,5	19,5	29	0,028	0,756	0,784	0,001	0,058	0,059

ANEXO 11. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Control.

ANEXO 12. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. LB3.

ANEXO 13. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 7.

Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
Cepa	longitud raíz	logitud vástago	longitud planta	peso fresco raíz	peso fresco vástago	peso fresco total	peso seco raíz	peso seco vástago	peso seco total
Makria 7									
1	3,7	11,3	14	3	107	110	3	28	31
2	3,4	5,1	8,5	4	135	139	1	8	9
3	7	9,5	16,5	4	117	121	1	9	10
4	4	10,5	14,5	9	196	205	3	13	16
5	4	10,2	14,2	1	106	107	1	8	9
6	3	11,5	14,5	3	144	147	3	12	15
7	5	13	18	6	148	154	1	12	13
8	3,5	11	14,5	11	127	138	2	8	10
9	5	11	16	16	205	221	2	5	7
10	5	12,5	17,5	5	127	132	1	8	9
11	5,8	10	15,8	10	115	125	2	7	9
12	9	9,5	18,5	6	149	155	1	9	10
13	4,8	11,4	16,2	11	168	179	3	10	13
14	3,5	11	14,5	4	155	159	4	8	12
15	8,4	10	18,4	1	111	112	1	7	8
16	9	13,8	22,8	0,011	0,241	0,252	0,001	0,014	0,015

ANEXO 14. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 8.

Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
Cepa	longitud raíz	logitud vástago	longitud planta	peso fresco raíz	peso fresco vástago	peso fresco total	peso seco raíz	peso seco vástago	peso seco total
Makria 8									
1	4	13,5	17,5	3	215	218	1	16	17
2	8	15	23	4	268	272	1	21	22
3	7,7	11,7	19,4	2	398	400	16	23	39
4	3,4	18	21,4	4	220	224	1	16	17
5	2,1	15,1	17,2	4	256	260	2	9	11
6	4,5	11,5	16	1	149	150	1	9	10
7	5,5	13,5	19	5	214	219	1	12	13
8	5	15,5	20,5	12	216	228	2	11	13
9	4,5	15,1	19,6	4	193	197	1	11	12
10	4,8	17,5	22,3	10	425	435	1	27	28
11	6,3	12,2	18,5	8	237	245	1	10	11
12	6,5	15	21,5	6	274	280	1	17	18
13	4,3	16,2	20,5	6	299	305	1	20	21
14	5	13	18	8	198	206	1	14	15
15	6	14	20	8	428	436	1	22	23
16	9	13,8	22,8	0,011	0,241	0,252	0,001	0,014	0,015

ANEXO 15. Longitud, peso fresco, peso seco en plantas de Tomate. Makria 9.

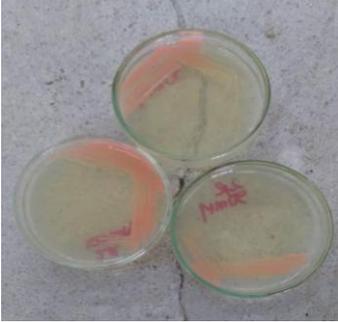
Columna1	Columna2	Columna3	Columna4	Columna5	Columna6	Columna7	Columna8	Columna9	Columna10
Cepa	longitud raíz	logitud vástago	longitud planta	peso fresco raíz	peso fresco vástago	peso fresco total	peso seco raíz	peso seco vástago	peso seco total
Makria 9									
1	6,5	12,5	19	4	179	188	2	13	15
2	6,8	13,2	20	6	205	211	2	13	15
3	5,5	8	13,5	5	103	108	3	7	10
4	4,6	13	17,6	3	134	137	2	10	12
5	8,5	14	22,5	9	244	253	1	15	16
6	5	14	19	8	220	228	1	11	12
7	7	13	21	7	189	196	3	11	14
8	5	12	17	2	160	162	1	12	13
9	5	13	18	4	170	174	1	13	14
10	4	12	16	4	156	160	4	9	13
11	6,8	10	16,8	4	193	197	2	13	15
12	6	10	16	8	205	213	2	12	14
13	3,2	7,5	10,7	6	128	134	1	11	12
14	5,7	10,7	16,4	2	212	214	1	18	19
15	4,7	14	18,7	5	248	253	1	14	15
16	2,5	11	13,5	1	135	136	2	9	11

ANEXO 16. Medio NF (libre de N) semisólido.

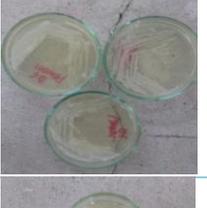
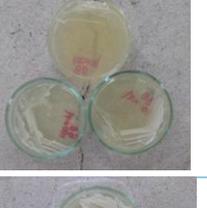
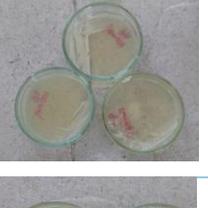
N o	Componente	Solución Stock
1	Manitol o sucrosa como fuente de carbono	20g/L
2	K ₂ HPO ₄	0.2g/L
3	NaCl	0.2g/L
4	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.2/L
6	K ₂ SO ₄	0.16g/L
7	CaCO ₃	5.0g/L

ANEXO 17. Resultados de la tolerancia al estrés salino de las *Rhodotorula* spp.

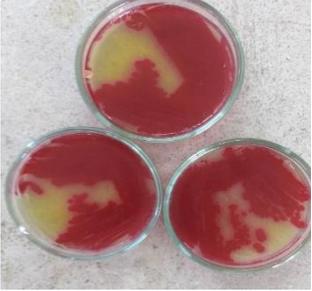
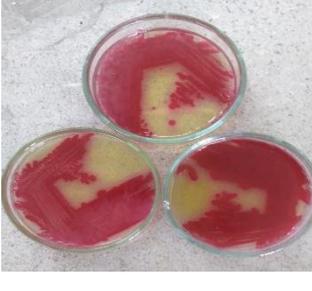
TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO RHODOTORULAS		
	CEPAS	
CONCENTRACIÓN DE SAL	R2	R4
0 mM		
25 mM		

<p>50 mM</p>		
<p>100 mM</p>		
<p>200 Mm</p>		

ANEXO 18. Resultados de la tolerancia al estrés salino de levaduras blancas.

TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO <i>Makria</i> spp. y Levadura blanca 3				
CEPAS	LB3	LB7	LB8	LB9
0mM				
25mM				
50mM				
100mM				
200mM				

ANEXO 19. Resultados de la tolerancia al estrés salino de *Azospirillum* spp.

	100mM 	200mM 
Sin sal.		