



**ESTUDIO DE LA CEPA DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515
COMO PROMOTORA DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE**

YUDI CAROLINA RODRIGUEZ MIRQUE

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. OCTUBRE DE 2019**



**ESTUDIO DE LA CEPA DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515
COMO PROMOTORA DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE**

YUDI CAROLINA RODRIGUEZ MIRQUE

ADRIANA CAROLINA ROJAS ARIAS

Asesor externo de la Universidad Antonio Nariño

SILVIO ALEJANDRO LÓPEZ PAZOS

Asesor externo de la Universidad Antonio Nariño

JOVANNA ACERO GODOY

Asesor Interno

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C. OCTUBRE DE 2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a toda mi familia que siempre me apoyaron, me brindaron todo su amor, su apoyo y aliento día a día para culminar todo este proyecto, por ayudarme para todo esto fuera posible.

A mi madre y a mis abuelos por siempre estar a mi lado, apoyarme en los momentos más difíciles, enseñarnos que cada día podemos ser mejores y alentarme siempre a seguir adelante, por confiar y creer en mí.

A mi hijo y mi esposo por el amor, la comprensión y acompañarme en cada etapa de este proceso, siendo ustedes los principales promotores de este sueño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme realizar este trabajo, a mi familia que me ha brindado su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, a pesar de las dificultades que se presentaron durante el camino.

A mi hijo y mi esposo infinitas gracias por su amor y comprensión, por siempre anhelar y desear lo mejor para mi vida.

Al profesor Silvio López que me brindó su apoyo, guía y asesoramiento durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Profesora Jovanna Acero Godoy por todo su acompañamiento y paciencia durante la elaboración de este proyecto.

A mis amigas por esos momentos compartidos de apoyo y enseñanza.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. ANTECEDENTES.....	13
4. MARCO TEÓRICO.....	18
4.1. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	18
4.2. Descripción morfológica y botánica.....	18
4.3. Requerimientos climáticos del suelo:.....	21
4.4. Producción de tomate.....	22
4.5. Microorganismos promotores de crecimiento.....	24
4.6. <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	27
4.8. Proteínas hipotéticas.....	30
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	32
6. RESULTADOS.....	35
7. DISCUSIÓN.....	41
8. CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44
ANEXOS.....	48
Anexo 1. Resultados programa ANOVA.....	48
Anexo 2. Predicción de proteínas hipotéticas relacionadas con fijación de nitrógeno y producción de AIA.....	53
Anexo 3. Cuantificación de nitrógeno en tejido foliar.....	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo fenológico de tomate (22).	21
Figura 2. Área sembrada de cultivo de tomate en Colombia y los principales departamentos productores, 2016 (23).	23
Figura 3. Vías de biosíntesis de AIA en bacterias (31).	27
Figura 4. Plantas después de 4 semanas de su siembra, se puede apreciar que las plantas inculadas con <i>P. extremaustralis</i> CMPUJU 515 (azul) muestran un mejor desarrollo en sus hojas. (Amarillo: Control negativo, Verde: <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Blanco: Fertilizante).	35
Figura 5. Plantas con seis semanas. (Amarillo: Control negativo, Azul: <i>P. extremaustralis</i> CMPUJU 515, Verde: <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Blanco: Fertilizante).	36
Figura 6. Plantas con siete semanas de crecimiento (Amarillo: Control negativo, Azul: <i>P. extremaustralis</i> CMPUJU 515, Verde: <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Blanco: Fertilizante).	36
Figura 7. Plantas con 8 semanas de crecimiento. (Amarillo: Control negativo, Azul: <i>P. extremaustralis</i> CMPUJU 515, Verde: <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Blanco: Fertilizante).	37
Figura 8. Raíces y tallos de plantas de tomate.	38
Figura 9. Evaluación de fenotipos asociados a promoción de crecimiento en tomate después del tratamiento con <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515 y fertilizante con respecto al peso húmedo, peso seco, longitud y área foliar, de las plántulas de tomate 8 semanas después de la siembra. Barras con asterisco son significativamente diferentes ($p < 0.1$).	39
Figura 10. Representación gráfica de las proteínas encontradas en el genoma de <i>P. extremaustralis</i>	40



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**ESTUDIO DE LA CEPA DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515
COMO PROMOTORA DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE**

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza originaria de la región andina en Suramérica, ampliamente distribuida a nivel mundial, genera gran impacto a nivel nutricional y económico gracias a su alto contenido en vitaminas A y C. La alta demanda de esta hortaliza, y el daño generado en el suelo por productos químicos usados para aumentar la producción, tales como aumento de la acidez ó erosión del suelo, entre otras, se ha buscado otras alternativas en fertilización, incluyendo bacterias promotoras de crecimiento vegetal que habitan en la rizósfera de plantas, son ampliamente conocidas por aumentar crecimiento y productividad en cultivos. En este trabajo se evaluó la capacidad de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515 como bacteria promotora de crecimiento, teniendo en cuenta que en el género *Pseudomonas* sp. existen diversas especies con dicha capacidad, como *P. aeruginosa* PAO1 que promueve el crecimiento en plantas de lechuga, frijol, tomate, entre otras. Con este fin se realizaron bioensayos con inóculos de 1×10^{10} UFC/ml de la bacteria a semillas de tomate previamente desinfectadas, y cultivadas en suelo estéril. Se encontró que *P. extremaustralis* CMPUJU 515 promueve el desarrollo de las plantas de tomate, evidenciado en fenotipos asociados a raíz, tallo, y área foliar. Se identificaron 1417 proteínas

hipotéticas, grupo en el cual se identificaron varias relacionadas con genes *nif*, *ipdc*, *hisC1* e *hisC2*, asociados a fijación de nitrógeno y producción de ácido índol acético. Este trabajo es un aporte al uso de microorganismos asociados a ambientes extremos, y su potencial en promoción de crecimiento vegetal.

Palabras clave: *Pseudomonas extremaustralis*, psicrófilo, *Solanum lycopersicum*, promoción de crecimiento vegetal, proteína hipotética

ESTUDIO DE LA CEPA DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515 COMO PROMOTORA DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) hace parte de una de las hortalizas más importantes en Colombia. Según evidencias históricas, etnobotánicas y arqueológicas su origen se centra en Suramérica, además se ha evidenciado que todas las especies silvestres del tomate se originan en la región andina de los siguientes países: Chile, Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia. Las evidencias apuntan a que fue en México donde inicia su proceso de domesticación (1). Gracias a los datos y la historia que se ha obtenido con el paso de los años sobre el tomate, los agricultores han podido identificar que esta planta se ve afectada por diferentes tipos de patógenos como bacterias *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, hongos como *Fusarium oxysporum*, nematodos incluyendo *Meloidogyne incognita*, y por factores extrínsecos como la temperatura o la poca fertilidad del suelo; por esto se ha visto la necesidad de buscar soluciones a este tipo de problemas sin afectar el medio ambiente ya que normalmente en la agricultura se usa productos químicos porque son una solución rápida, pero con el paso del tiempo su uso va deteriorando el medio ambiente. Se ha estudiado el uso de bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR del inglés Plant Growth Promotion Rhizobacterium) que son reconocidas por su acción sobre el desarrollo en plantas, con mínimas repercusiones (2). Por su parte, en el tomate se puede realizar la evaluación de este microorganismo gracias a la evaluación de características físicas como altura y peso del tallo y raíz, y el área foliar. Además es de importancia conocer todos los procesos y aspectos que conlleva cultivar esta planta, como las plagas, enfermedades, variedades de tomate, poscosecha, el control de malezas ya que estas pueden interferir en el crecimiento de la planta y comercialización; los aspectos ambientales (temperatura, luz y humedad) poseen una gran importancia durante su crecimiento (3).

Se propone que el género *Pseudomonas* puede ejercer un efecto benéfico directo, a través de la síntesis de fitohormonas y de vitaminas, estimulación de la germinación de semillas y

emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno, solubilización de fósforo (P) inorgánico, y de manera indirecta por medio de síntesis de antibióticos y fungicidas. En virtud de su capacidad de adaptación fisiológica y versatilidad metabólica, las bacterias en las zonas de raíces de las plantas son un agente clave del cambio del suelo en los agroecosistemas, con efectos positivos, en cuanto a tolerancia de altos contenidos de sales, aumento en los rendimientos de los cultivos y mejoras en la calidad del suelo, respecto a la disponibilidad de nutrientes; o, esta regulación está mediada por el *quórum sensing* bacteriano, las cuales se deben adaptar para alcanzar una alta proliferación y, de esta manera, se estimulan, activan y mantienen en la zona radicular, por medio de la liberación selectiva de exudados y lixiviados, por parte de las plantas y otros microorganismos (4).

Al respecto *P. extremaustralis*, es una bacteria aislada en la Antártida, capaz de soportar diferentes tipos de estrés incluyendo bajas temperaturas, gracias a estas características se cree que puede ayudar a la planta a desarrollarse con mejores características fenotípicas, y en los casos en que la planta se vea sometida a algún tipo de estrés permitirle crecer. Esta bacteria se aisló relativamente hace pocos años por lo que aún no se conoce todas sus posibles funciones y que daños pueda causar. Aunque se ha descrito su genoma aún no se ha podido conocer las funciones de todas sus proteínas, es importante conocer cuales intervienen en la promoción de crecimiento (5).

A partir de los grandes avances realizados en los últimos años en donde se pudo reconocer la existencia de las proteínas aún no se conoce la función de estas, lo que actualmente ha llevado a realizar diferentes ensayos en donde se pretende conocer la función de estas proteínas conocidas como “proteínas hipotéticas”, En general, aproximadamente entre el 30 al 40% de las secuencias en los datos genómicos corresponden a proteínas hipotéticas cuya estructura tridimensional (3D) y función es desconocida (6). El uso de herramientas bioinformáticas permite el diseño racional de los experimentos para identificar las funciones de estas proteínas. Los enfoques tradicionales de la bioinformática para la anotación de la función incluyen la búsqueda de las funciones basadas en homología.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de *Pseudomonas extremaustralis* para promoción de crecimiento en tomate, e identificar proteínas hipotéticas relacionadas.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar el efecto de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 sobre el crecimiento en plantas de tomate *in vivo*.
- Desarrollar una clasificación funcional de proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515.
- Caracterizar proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 relacionadas con promoción de crecimiento en tomate.

3. ANTECEDENTES

Los microorganismos que encontrados en el suelo modifican los patrones de desarrollo y producción de los cultivos a través de mecanismos biológicos, los cuales permiten una adecuada interacción. Se han registrado mayor número de estudios con *P. fluorescens* como promotora de crecimiento en donde se evidenció una actividad mayor en la producción en las plantas de tomate inoculadas que en las plantas sin inocular, pero con relación a la promoción de crecimiento vegetal, no se evidenció aumento del sistema radicular en las plantas inoculadas, por el contrario se evidenció que su tamaño disminuyó un poco con relación a las plantas sin inocular (2). Gracias a esto se ve viable utilizar microorganismos como potenciadores de crecimiento en plantas y además ciertas características se deben tener en cuenta para poder determinar su principal potencial. Es importante destacar la actividad de PGPRs, ya que forman parte esencial de las nuevas tecnologías en la agricultura, según Camelo *et al.* (4) este proceso inicia con mecanismos de quimiotaxis que se encuentran relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y con algunos sistemas de regulación codificados genéticamente. Estos factores tienen gran importancia en la habilidad de colonizar la rizósfera y además mantiene la comunicación entre las células de la raíz con los microorganismos presentes en el suelo, formando de esta manera una interacción que permite un beneficio mutuo.

Ribaudo *et al.* (7) al evaluar algunas de las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal en dos plantas de interés agronómico, como el arroz (*Oryza sativa*) y el tomate, demostró que *Azospirillum brasilensis* promovía el crecimiento vegetal de arroz, principalmente del sistema radicular. La inoculación de plántulas de tomate con la rizobacteria *A. brasilensis* promueve el crecimiento, este crecimiento se midió en: aumento de la masa de tallos y raíces, altura de los tallos y superficie total de la raíz. El empleo de PGPRs constituye una alternativa biotecnológica para mejorar la producción de especies de interés hortícola, se puede medir evaluando su efecto en la germinación y crecimiento de plántulas de tomate y pimiento (*Capsicum annuum L.*) con rizobacterias pertenecientes al género *Bacillus*, el cual mostro un efecto positivo en el crecimiento de estas dos plantas (8).

Se relacionadas el crecimiento de la planta y del fruto con la calidad nutricional al que tienen acceso, además de otros factores ambientales y genéticos. En este caso Ardila (9) utilizó tomates híbridos ya que estas variedades poseen mejoramientos genéticos, lo que asegura que las semillas poseen un porcentaje alto en vigor, que tienen buena uniformidad, alta producción y calidad, por otra parte a algunas semillas también se les ha incorporado resistencia a algunas enfermedades, es lo que ha ayudado a incrementar la producción de tomate. Identificó que la variedad de tomate híbrida Franco tuvo mejor crecimiento y frutos más grandes en comparación a los híbridos Beverly y SVR.

Durante la producción de alimentos se han usado abonos para el tratamiento del suelo, según Rivera *et al.* (10) en este caso la pollinaza 1,0% (excretas de aves) es el mejor tratamiento tipo abono, ya que la pollinaza al 3,0% produjo fitotoxicidad en las plantas de limón que fueron el objeto de estudio, estas murieron a los seis meses después del transplante. Los resultados obtenidos muestran que los subproductos agrícolas, como excretas de aves, pueden ser una alternativa de fertilización al utilizarlos como soportes orgánicos de PGPRs, debido a que mejoran la calidad del suelo y aumentan el crecimiento de la planta sin usar productos químicos.

Las plantas tienen la capacidad de responder al estrés hídrico gracias a que desarrollan adaptaciones evolutivas tanto a nivel morfológico, anatómico y celular, como defensa natural y además les permite vivir en condiciones de constante estrés y que de esta misma manera les permita continuar con su ciclo de vida evitando daños irreparables en las plantas, también poseen mecanismos de aclimatación que se activan en respuesta a estrés en este caso hídrico, cuando esto ocurre en la planta también se evidencian varios cambios como el crecimiento, en la limitación de la expansión foliar afectando por ende en proceso de la fotosíntesis, la sensibilidad de las raíces ya que se ha detectado que una elongación de las raíces rápida y temprana es un indicador importante de resistencia al estrés. La disponibilidad de agua afecta de manera significativa la relación entre el crecimiento de la planta y la raíz, cuando la planta está sometida a estrés la raíz continúa su desarrollo mientras que la parte superficial deja de

crecer, debido a que las plantas mediante sus raíces van en búsqueda de agua en las zonas más profundas del suelo (11).

Según Barquero *et al.* (12) cuando se evalúa el efecto de microorganismos en plantas es importante determinar variables que ayuden a identificar la existencia de algún cambio en la planta, algunos de estos parámetros son: densidad aparente y de partículas; poros totales; estabilidad de agregados; resistencia a la penetración (RP); las variables químicas: pH; conductividad eléctrica; contenido de C y N; conductividad hidráulica; relación C/N; contenido de nutrientes en suelos y foliares; las variables biológicas: respiración de suelos, unidades formadoras de colonias de hongos, bacterias y actinomicetos y el peso fresco y seco foliar.

Se ha documentado que es posible lograr un alto rendimiento en la producción de tomate empleando grandes cantidades de productos químicos, ya que actúan de manera rápida y eficaz, interviniendo también en los costos totales de producción en un 20-25 %. En condiciones de invernadero se observó que la generación y acumulación de biomasa por las plantas de tomate se afectó por las condiciones climáticas internas del invernadero, ya que fueron diferentes en los dos ciclos analizados (13), es importante conocer todos los factores del cultivo de tomate en invernadero que puedan interferir en la producción.

Según García *et al.* (14) se han encontrado restos de plaguicidas en tomates comercializados en Colombia, que han sido usados para eliminar plagas que atacan los cultivos y producen grandes pérdidas, además se resalta el hecho de convertirse en un problema para la salud, debido a que los consumidores, van acumulando, concentrando y biomagnificando los residuos de plaguicidas mediante la alimentación en lípidos tisulares y fluidos corporales. Por este motivo se ve la importancia de realizar controles continuos a los cultivos ya que se puede asegurar que los tomates comercializados no contengan sustancias perjudiciales para la salud del consumidor, por este motivo busca alternativas que den respuesta a esta problemática sin necesidad de afectar al consumidor final, optando por microorganismos tengan esta misma finalidad

Según Benjumeda (15) las PGPR producen diferentes tipos de beneficios: potencian crecimiento, mejoran la disponibilidad o la absorción de minerales y otro tipo de compuestos (nitratos, fosfatos, etc.), ayudan a la producción de hormonas necesarias en el desarrollo de los vegetales (fitohormonas, giberelinas). Además protegen a plantas y cultivos contra posibles agentes patógenos y combaten la contaminación de los suelos, todas estas características hacen que las PGPR estén siendo muy estudiadas por su potencial y también siendo modificadas para potenciar sus beneficios aún más, no solo para la promoción de crecimiento en plantas, o para ser usadas como biocontrol, sino también en las descontaminación de suelos y recuperación de ecosistemas.

Las especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* son muy atractivas debido a su gran potencial como biocontrol bacteriano de plantas. En este caso *P. aeruginosa* cepa D4 y *B. stratosphericus* cepa FW3 se aislaron de los relaves de las minas en Corea del Sur (16), después de realizar varias pruebas en estos microorganismos se observó una actividad antagonista mejorada contra *P. syringae* DC3000, además de producir biocatalizadores para la promoción del crecimiento en plantas. El estudio de *S. lycopersicum*, arrojó datos de la regulación de la proteína 1a (PR1a) y fenilalanina amoniaco liasa (PAL) que se cree están relacionados con la defensa contra el patógeno, empleando métodos de acción directos e indirectos y su posible uso como agente de biocontrol. El tomate *S. lycopersicum* L. cv. *Pusa Ruby*, posee tolerancia al frío y una modificación genética en su respuesta a la toxicidad, desarrollando así mediante la sobreexpresión constitutiva del gen de *Nicotiana tabacum* *Osmotin* (17). Posterior a la inoculación de la semilla no se determinaron diferencias significativas en el tomate transgénico en la germinación y en el establecimiento de plántulas al ser sometido a un tratamiento de baja temperatura (15°C).

Características extremas como el frío intenso, la baja humedad, la poca disponibilidad de agua en estado líquido, los períodos de alta radiación solar y oscuridad total en periodos largos de tiempo, significan que la Antártida representa un entorno inhóspito para el desarrollo de la vida, pero *Pseudomonas* principalmente se basa en sus bajos requerimientos nutricionales y su gran diversidad metabólica, permitiéndole utilizar numerosos compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (18). Gracias a estas características algunas

especies de *Pseudomonas* son capaces de sobrevivir a diferentes tipos de estrés extremo. Comúnmente se conoce que una amplia gama de estrés biótico y abiótico afecta de forma negativa el crecimiento y la productividad de las plantas en todo el mundo.

Según Ashrafi *et al.* (19) los grandes avances científicos de los últimos años relacionados con rizobacterias han determinado que el estudio de genes individuales no se puede considerar como un enfoque eficaz para la comprensión de los mecanismos de tolerancia, ya que estas tensiones son frecuentes y, a menudo, combinadas entre sí, y una gran cantidad de genes están involucrados en estos mecanismos. Además se debe tener en cuenta la interacción que se da entre todos los factores que intervienen en el proceso, para de esta forma determinar de manera real el papel que cumple en estos procesos.

Catone (20) realizó un análisis *in silico* en el que pudo determinar que algunas proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis*, son homologas con genes estructurales relacionados con la producción de alginato conocida como una vía metabólica alterna al PHA, además realizó un análisis cuantitativo por medio de cultivos a diferentes concentraciones de carbono, el cultivo suplementado con glucosa 3 % obtuvo la mayor producción de alginato (2,43 % de alginato/g peso seco), a las de 24h de incubación, concluyo que *P. extremaustralis* puede producir alginato y que los niveles de síntesis varían según la fuente de carbono utilizada.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Tomate (*Solanum lycopersicum*)

Tabla 1: información taxonómica tomate (*Solanum lycopersicum*)

Nombre Científico:	<i>Solanum lycopersicum</i>
Nombre comercial:	Español: Tomate / Jitomate, Inglés: Tomato, Italiano: Pomodoro
Familia:	Solanáceas
Género:	<i>Solanum</i>
Variedad:	<i>Lycopersicum</i>

El tomate es una de las hortalizas más relevantes debido a su valor nutricional ya que es una excelente fuente de sustancias antioxidantes como licopeno y betacaroteno, y de vitaminas: C y A. Para nuestros agricultores, es una gran ventaja el corto tiempo producción y además que este cultivo se adapta a diferentes tipos de suelos (3).

4.2. Descripción morfológica y botánica

- Raíz

Esta planta herbácea, posee un tallo semileñoso, cuyo sistema radicular está compuesto por 2 tipos de raíz, la principal es de extensión corta y posee numerosas ramificaciones a las que se conocen como raíces secundarias. En la parte superior, al nivel del suelo, se desarrollan raíces adventicias que ayudan a mejorar el anclaje de la planta al sustrato. La raíz está compuesta por una epidermis o parte externa en donde se encuentran pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes. En el interior se localizan el córtex y el cilindro central conformado por el xilema, que es el tejido responsable del transporte de los nutrientes desde la raíz hacia las hojas y otros órganos de la planta (21).

- El tallo

Generalmente mide entre 2 y 4 centímetros en la base de la planta y en la parte superior donde se están formando nuevas hojas es más delgado. El tallo también está conformado por epidermis, que esta conformados por pelos glandulares, la corteza, cilindro vascular (xilema) (22).

- Las hojas

Las hojas son imparapinadas, conformadas por foliolos alternos (hojas compuestas) e impares que terminan en un foliolo individual en su parte apical. El tipo de crecimiento de la planta y la temperatura determina el número de hojas por tallo y la frecuencia de aparición de hojas (22).

- La flor:

Posee órganos femeninos y masculinos funcionales. En cada racimo se forman varias flores, una sola planta puede producir 20 o más inflorescencias (racimos) sucesivas durante un ciclo de cultivo, bajo condiciones de invernadero. La formación de racimos florales ocurre más o menos cada 11 o 12 días (22).

- El fruto

Principalmente el fruto está constituido por un 94.0 – 95.0 % de agua, el restante es una mezcla compleja en la que predominan constituyentes orgánicos, los cuales dan al fruto su sabor característico y su textura. La planta empieza a producir frutos de 60 a 70 días, que inicia desde la antesis (cuajamiento) hasta el momento de la cosecha (22).

- Etapas de desarrollo

Durante su crecimiento, las etapas difieren en cuanto a las necesidades de agua y nutrientes frente al desarrollo mismo de la planta. Es importante reconocer que los tiempos son indicativos, ya que pueden ser diferentes dependiendo de la variedad, el manejo del cultivo y de la zona en la cual se está realizando el cultivo (22).

- **Etapa inicial o establecimiento de la planta:**

El tomate es un cultivo que puede ser anual o continuo, germina de 4.0 a 7.0 días después de que fue sembrada la semilla, con los requerimientos nutricionales necesarios. A partir de este momento la raíz empieza a desarrollarse e inicia la formación de la parte aérea de la planta (22) (21).

- **Crecimiento vegetativo:**

En este período si la planta cuenta con los nutrientes y requerimientos ambientales óptimos crece rápidamente, floreciendo y desarrollando frutos de forma idónea. Pasados 70 días, el desarrollo vegetativo disminuye drásticamente, encontrándose en un nivel mínimo e inicia la acumulación de materia seca en hojas y tallos (22) (21).

- **Floración y polinización:**

La floración y cuaja empiezan alrededor de 20.0 – 40.0 días después del trasplante si cuenta con las condiciones medioambientales, el manejo dado al cultivo, además depende de la variedad del tomate, y continúa durante el resto del ciclo de crecimiento. Normalmente la polinización es por medio de abejas, viento o la aplicación de hormonas (auxinas) (22) (21).

- **Desarrollo del fruto:**

La fruta empieza a desarrollarse y a crecer acumulando durante este periodo la mayor cantidad de materia seca en la fruta a un ritmo relativamente estable, hasta que el fruto se encuentre en la etapa final de su desarrollo (22) (21).

- **Madurez fisiológica y cosecha:**

La madurez de la fruta se logra entre 80.0 a 120.0 días después del trasplante. La cosecha es permanentemente; sin embargo, se puede ver limitada por factores climáticos, nutricionales o económicos (22).

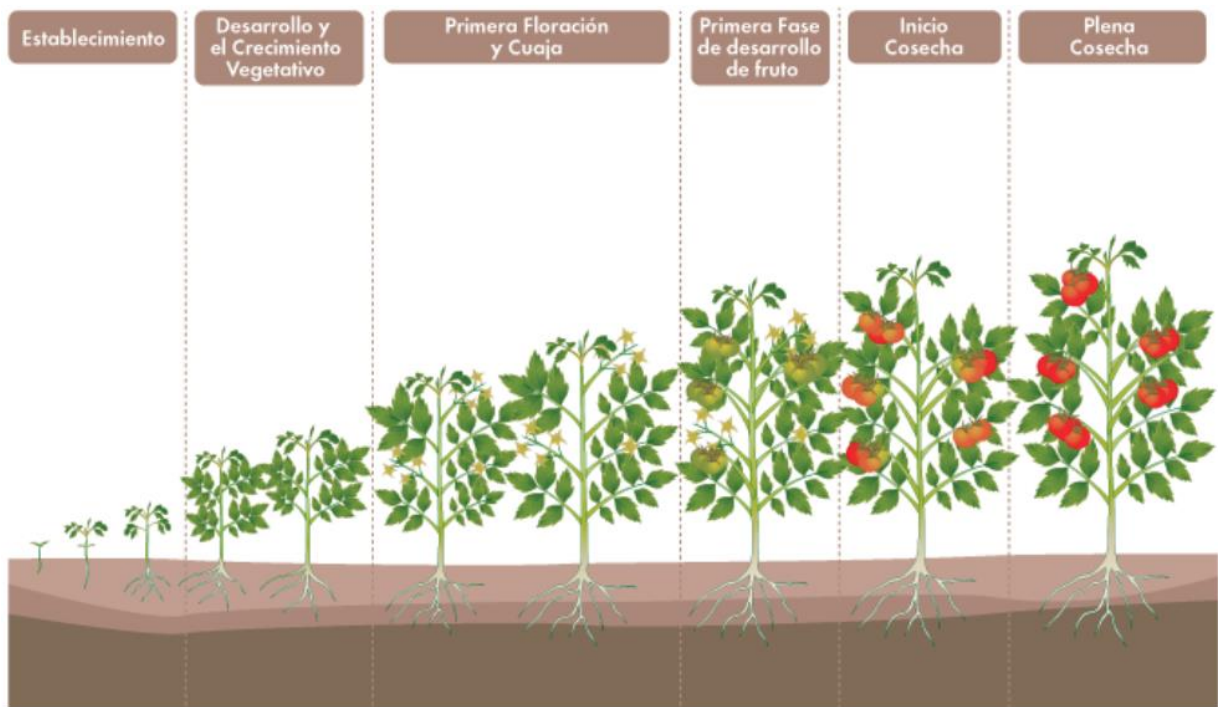


Figura 1. Ciclo fenológico de tomate (22).

4.3. Requerimientos climáticos del suelo:

- Suelo

Requiere de un alto contenido de materia orgánica y suficiente agua, además es importante tener en cuenta que el tomate debe disponer de suelos con buena porosidad, bien aireados, capacidad de almacenar agua, se prefieren suelos con textura franca (22).

-El pH debe oscilar entre 6.0 y 7.0.

-La conductividad eléctrica óptima está entre 1,5 y 20.0 dS/m.

Densidad aparente: Determina la fertilidad y el grado de compactación del suelo. Puede variar entre 0,3 – 0,8 g/cm³ en los suelos con alto contenido de materia orgánica o suelos arcillosos, y entre 1,3 – 1,8 g/cm³ en suelos con textura arenosa o compactados. Los suelos con densidad aparente mayor a 1,8 g/cm³ limitan el desarrollo radical (22).

Porosidad: Importante para el movimiento y retención del agua en el suelo. El tamaño para dar equilibrio entre los macroporos y los mesoporos está entre 1 y 3 mm, pues permite el suministro de aire adecuado para el desarrollo de los cultivos. La capacidad de retención de agua es una de las características más importantes del suelo para cultivos ya que determina la cantidad y frecuencia de los riegos (22).

- Climatológicas

El tomate es una hortaliza de clima cálido y moderado, susceptible a heladas y temperaturas bajas. Crece en temperaturas de entre 20 a 25°C en el día y de 15 a 20°C en la noche, favoreciendo así el desarrollo normal de los procesos bioquímicos, el crecimiento vegetativo, la floración y fructificación. Bajo invernadero la temperatura mínima para la producción de tomate es de 8-12°C. Temperaturas inferiores y prolongadas debilitan la planta generando progresiva decadencia o muerte. La temperatura máxima no debe superar los 32° C, ya que a temperaturas superiores se estimulan los procesos bioquímicos y la toma de nutrientes, siendo excesivos y agotadores para la planta; además, con las altas temperaturas se presentan desórdenes fisiológicos, se detiene la floración y la planta puede morir (22).

- Riego

La humedad relativa ideal para el desarrollo, crecimiento y fertilidad del cultivo de tomate oscila entre el 60% y el 85%. Se requiere de 6 a 8 horas diarias de luz. El riego se debe suministrar frecuentemente y de manera uniforme, ya que la insuficiencia de agua influye negativamente en el desarrollo y en la producción (21).

4.4. Producción de tomate

El tomate es una de las hortalizas más difundidas en todo el mundo y tiene gran valor económico, en este caso Colombia ocupa el puesto 32 en la producción de tomate a nivel mundial, ya que en el año 2013 se produjeron de 412.351,2 toneladas, siendo el principal departamento productor Norte de Santander con 119.787 toneladas, pero se debe tener en cuenta que la producción puede variar ya que en el año 2009 tuvo una producción de 455.693 toneladas, esta variación puede ser causada por las necesidades de agua y nutrientes a las que se vea sometida la planta durante su desarrollo (22); gracias al aumento de la demanda de

alimentos de manera continua a causa del crecimiento de la población, ya que también aumenta la demanda de alimentos principalmente en países sub desarrollados, además también se cuenta con una producción de tomate bajo invernadero, ya que es posible continuar con la producción durante todo el año. En el año 2016 en Colombia se produjeron 632.268 toneladas de tomate, siendo Antioquia el mayor productor con 156.421 toneladas, seguido por Norte de Santander con 87.017 toneladas (23).

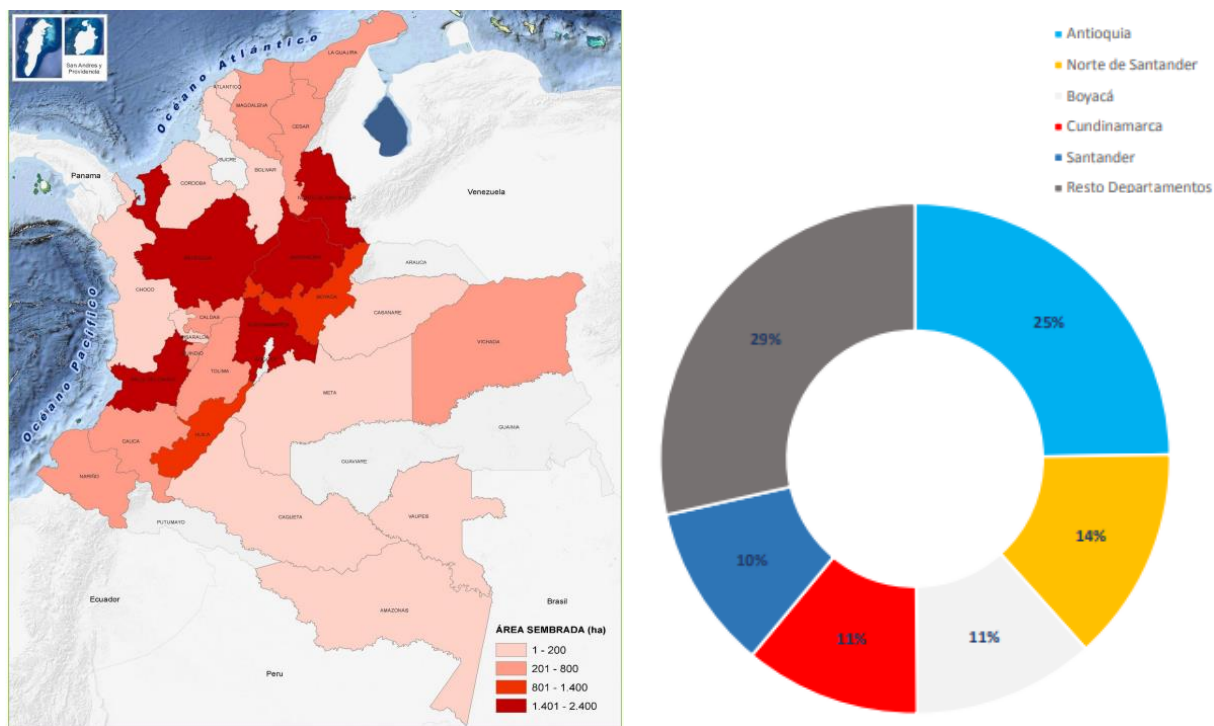


Figura 2. Área sembrada de cultivo de tomate en Colombia y los principales departamentos productores, 2016 (23).

El tomate está en la lista de las hortalizas más consumidas del mundo. En 2016, se cultivaron 177 millones de toneladas de tomates en todo el planeta, lo que significó que la producción fue casi un 30% mayor que diez años antes. Aproximadamente, se han plantado 5 millones de hectáreas de tomates en todo el mundo y, de media, se cosechan 3,7 kilos de tomates por metro cuadrado. Los principales productores son China y la India, aunque en la India el rendimiento es bajo, por debajo de los 2,5 kilos por metro cuadrado. Esta cantidad contrasta fuertemente con los rendimientos que los productores consiguen en los Estados Unidos (9,03

kg/m²), España (8,62 kg/m²) y Marruecos (8,08 kg/m²). El rendimiento holandés se sitúa muy por encima del resto del mundo, con una media de 50,7 kg/m² (22).

4.5. Microorganismos promotores de crecimiento

Los biofertilizantes son soportes que contienen microorganismos vivos aplicados a la semilla, para la colonización de la rizósfera, o en el interior de la planta, que promueven el crecimiento porque aumenta el suministro o disponibilidad de nutrientes primarios a la planta (24). El uso de biofertilizantes es importante, pues estos suplen o complementan el aporte de los fertilizantes minerales, los cuales, a pesar de resultar beneficiosos, se ha comprobado que causan daños al ambiente (como la acidificación de los suelos por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados). Existen distintos tipos de biofertilizantes, como los abonos y el compost, así como aquellos que incluyen inoculantes microbianos y otros derivados de subproductos agrícolas y animales. Los microorganismos cumplen funciones de descomposición, solubilización de nutrientes y estimulación del crecimiento de las raíces; por eso son unos excelentes fertilizantes biológicos y una alternativa tecnológica primordial para el desarrollo de nuevas soluciones. Para aplicaciones agrícolas los más utilizados son las bacterias, los hongos, las algas y los actinomicetos (12).

Entre los géneros de bacterias que forman parte del grupo de PGPR se puede encontrar a *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* entre otros, se encontró que el mecanismo más común para la solubilización de fosfatos minerales es la producción de ácidos orgánicos y la mineralización por enzimas fosfatasa a los fosfatos orgánicos, debido a la realización de estos procesos el P queda disponible en el suelo para el aprovechamiento de las plantas, y finalmente es absorbido y utilizado para su óptimo crecimiento y desarrollo (8).

Se ha evaluado la protección de *S. lycopersicum* var. Río Grande inoculado con PGPRs frente a la infección con el patógeno necrotrófico *Sclerotium rolfsii*. Se evaluó la promoción del crecimiento y mortalidad de las plantas, la actividad antifúngica, la producción de sideróforos

y la expresión de los péptidos defensina y snakin. Además se realizaron experimentos combinando la inoculación de la planta con *P. pseudoalcaligenes* y *A. brasilense* y posteriormente se realizó el enfrentamiento con *S. rolfsii*. Se identificó que las plantas control tuvieron el mayor índice de mortalidad en comparación con los otros 2 casos, en comparación de los dos ensayos que fueron inoculados con *P. pseudoalcaligenes* se encontró que obtuvieron un índice de mortalidad mayor que en plantas tratadas con *A. brasilense* y *P. pseudoalcaligenes*. Los mensajeros de los péptidos de defensina y snakin fue superior en ambos casos para plantas, estos resultados son muy concluyentes debido a que se plantea a PGPRs como una alternativa biológica contra *S. rolfsii* y podría ser evaluado para otros patógenos de suelo (25).

B. subtilis GIBI 200 también puede clasificar como candidatos a PGPRs ya que se evidenció capacidad para solubilizar fosfatos y producir ácido Indolacético (AIA) (26), además de influir de forma positiva en el desarrollo de las plantas de tomate generando un aumento significativo en la masa y en la longitud del tallo y de la raíz de la planta. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y *Burkholderia tropica* MTo-293, son bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno no simbióticas, se observó que ambos microorganismos poseen capacidad para colonizar diferentes plantas, como las de trigo, sorgo, colza y tomate; habiéndose comprobado su acción promotora sobre el crecimiento en tomate, a través del incremento en la cantidad y peso de frutos (27). Aunque los resultados obtenidos son prometedores se deben seguir realizando estudios en donde las condiciones de cultivo sean lo más real posible ya que de esta forma se conoce realmente el impacto de estas bacterias en las plantas.

- Fijación de nitrógeno:

El nitrógeno (N_2) es un elemento esencial para las plantas, ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, necesitándose principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento. Ha demostrado que la vía normal de ingreso de N_2 a las plantas proviene del suelo, y para ser absorbido, se debe encontrar mineralizado, como nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_3). Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización de nitrógeno (MN), para dejarlo disponible para

las plantas. Las plantas capacitadas para realizar FSN son principalmente especies de leguminosas (Familia Leguminosae) que como todos los vegetales absorben nitrógeno mineral del suelo, pero además pueden obtener nitrógeno atmosférico. Para que esto ocurra debe existir en el suelo bacterias del género *Rhizobium* sp., las que infectan y colonizan las raíces, provocando las deformaciones conocidas como nódulos. En los nódulos se transforma el nitrógeno atmosférico (N₂) a nitrógeno mineral (NH₃) por acción de la enzima nitrogenasa, nutriendo a la planta con el nitrógeno necesario para su síntesis proteica (28).

La fijación biológica de nitrógeno ocurre comúnmente en más de 100 géneros de varias divisiones filogenéticas entre bacterias y arqueas. Además se sabe que los genes *nif* codifican los componentes del complejo enzimático de la nitrogenasa. La subunidad estructural de la dinitrogenasa reductasa y las dos subunidades de la dinitrogenasa están codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* respectivamente. En muchos microorganismos como *Azotobacter vinelandii*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas stutzeri* y *Bradyrhizobium japonicum*, estas proteínas tienen secuencias similares y estructuras y funciones en común. Además, los análisis genéticos y bioquímicos revelaron que muchos genes *nif* adicionales, en los que se incluyen *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifQ*, *nifW*, *nifV*, *nifA*, *nifB*, *nifZ* y *nifS*, juegan un papel en la regulación de genes *nif* y en procesos de maduración de productos inactivos, como el transporte de electrones y la biosíntesis y ensamblaje de FeMo-cofactor (29).

- Solubilización de fosfatos

El gran número de rizobacterias Gram negativas aisladas que solubilizan fosfato usan la glucosa como fuente de carbono (24). Al usar este criterio, entonces las bacterias que posean la ruta de la oxidación directa de la glucosa tienen la habilidad de disolver los fosfatos. La solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H⁺ provenientes del citrato se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales de Al(OH)₃ o Fe(OH)₃ reduciéndolos y liberando al P. El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por las BSP, el cual involucra la formación de complejos con iones de metales provenientes de la roca fosfórica. Sin embargo, la enorme cantidad de rutas metabólicas generadoras de ácidos por las

bacterias, han hecho imposible el desarrollo de un conocimiento unificado sobre la microbiología de la solubilización del fosfato (30).

- Ácido Índol Acético

Es una hormona vegetal conocida como auxina, esta regula la división y expansión celular, diferenciación vascular, desarrollo de raíz lateral y dominancia apical, destacando un importante rol en la formación del xilema y la raíz por parte del aminoácido triptófano, que es el principal precursor para la biosíntesis de AIA microbiano, Diferentes vías de síntesis de AIA han sido identificadas en bacterias, cinco de estas rutas anabólicas son dependientes de triptófano. Las vías de síntesis de AIA más importantes y ampliamente distribuidas son la vía indol-3-piruvato (IPA), que se ha descrito principalmente en PGPR y la vía indol-3-acetamida (IAM) en fitopatógenos (31).

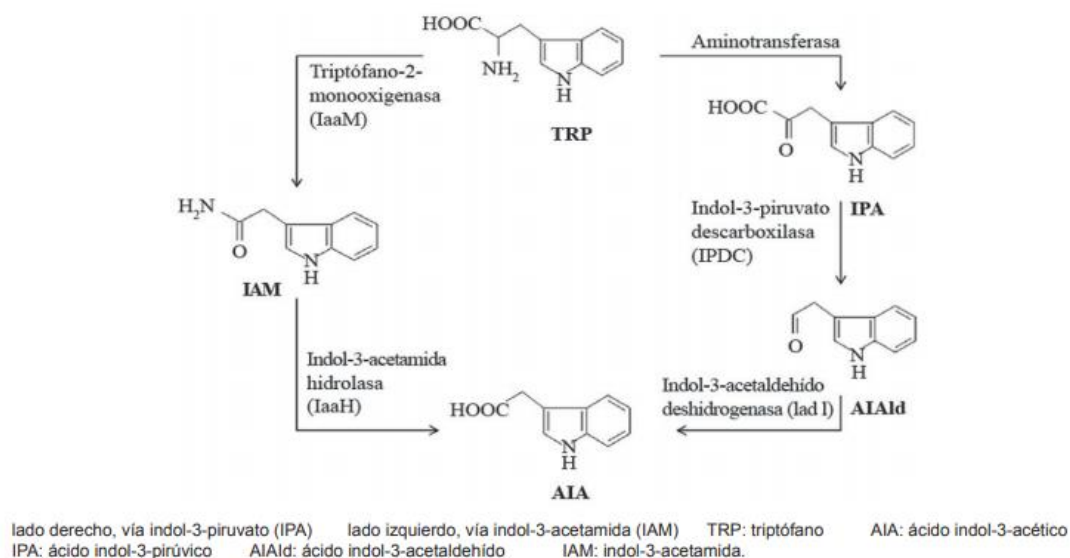


Figura 3. Vías de biosíntesis de AIA en bacterias (31).

4.6. *Pseudomonas extremaustralis*

P. extremaustralis es una bacteria Gram negativa que fue aislada por primera vez en un tanque de almacenamiento en la Antártida, llama la atención que presenta resistencia al estrés oxidativo, lo cual es asociado con un alto contenido de polihidroxibutirato (PHB) y además es capaz de tolerar y degradar hidrocarburos (5). Debido a su reciente descubrimiento aún no

hay ningún estudio de esta bacteria como promotora de crecimiento en tomate, pero sus características son de gran importancia ya que le confieren características únicas a este microorganismo y además sería un gran avance si se logra aplicar estas características para contrarrestar algunos efectos negativos que hay en el medio ambiente. Actualmente su genoma se encontrará disponible en la base de datos publica Gene Bank (NCBI)

Tribelli *et al.* (32) afirmó que la acumulación de PHB incrementa la motilidad y la supervivencia de las células en este caso células planctónicas en las biopelículas desarrolladas por *P. extremaustralis* en condiciones de frío. Esta capacidad de acumulación de PHB de la bacteria podría ser de gran importancia ya que se adapta en la colonización de nuevos nichos ecológicos en ambientes estresantes a los que se encuentren sometidas las plantas y los microorganismos.

Después de realizar diferentes estudios a *P. extremaustralis* su genoma indica que posee alto nivel de adaptabilidad a condiciones ambientales extremas, gracias a esto se identificaron algunos genes que pueden conferirle resistencia a compuestos tóxicos como los metales pesados (copRSABCD, czcABCD y znuABC) y arsénico (asrRBC) (33), también estuvieron presentes las rutas de degradación de fenol y alcanos.

Del grupo descrito anteriormente, *P. extremaustralis* es una de las bacterias más versátil, ya que es capaz de crecer en condiciones microaeróbicas y anaeróbicas. *Pseudomonas* sp. posee un regulador global redox Anr que controla el metabolismo anaeróbico mediante la activación y la represión de los genes objetivo, se encontró que Anr intervine en la formación de biopelículas, que son conocidas gracias a la protección que otorga contra el estrés físico y químico (34), estas características hacen que sea un candidato óptimo ya que de esta forma se puede aprovechar sus cualidades para usarse como biofertilizante. Los métodos de fabricación y utilización de los bioinoculantes presentes en las invenciones son de bajo costo, efectivos, amigables con el medio ambiente, así como de expedita obtención (35).

Posterior a al descubrimiento de *P. extremaustralis*, se iniciaron investigaciones para conocer e identificar sus características y se determinó que hay varios genes involucrados en la

desnitrificación (36). Además, se ha informado que en la Antártida, la tolerancia a la congelación de las bacterias psicotróficas a menudo está acompañado de tolerancia al estrés osmótico causado por falta de agua disponible. Los ambientes fríos están ampliamente distribuidos en el planeta, y los microorganismos psicotolerantes y psicrófilos han desarrollado diferentes estrategias de adaptación para hacer frente al estrés ocasionado por las bajas temperaturas, *P. extremaustralis* es una bacteria antártica capaz de crecer a bajas temperaturas y producir altas cantidades de polihidroxialcanoatos (PHA), los genes implicados en el metabolismo primario e incluyen los genes relacionados con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), al igual como los citocromos y los genes que codifican el metabolismo de los aminoácidos, fueron reprimidos a bajas temperaturas (37).

P. extremaustralis CMPUJ U515, es una cepa aislada de los suelos de superparamos septentrionales de los andes, aislada del Cráter La Olleta, ubicado en el Parque Nacional Natural Los Nevados en Colombia. Desde su aislamiento se almacenó en la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana como cepa de *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Esta cepa tolera rangos de temperatura de 4-35°C, identificando que su temperatura óptima es de 30°C. Es capaz de tolerar condiciones microaerofílicas y formar biofilm (38)

4.7. *Azospirillum brasilense*

Según Jijon et al. (39) los genes ipdC, his C1 e his C2 fueron aislados de *Azospirillum brasilense*, están involucrados en la vía de biosíntesis de ácido indol-3-pirúvico (IPyA) de ácido indol-3-acético (IAA). Existen diferentes mecanismos por los cuales *Azospirillum* puede afectar el crecimiento de las plantas directamente, es decir, fijar el nitrógeno atmosférico, sintetizar varios fitohormonas y enzimas, que producen óxido nítrico y sideróforos, y nutrientes minerales solubilizantes; o indirectamente, como ejercer actividad antimicrobiana, mejora de la actividad de la membrana, Los genes hisC1 e hisC2 que codifican estas enzimas han sido identificados, la enzima clave en esta vía es el fenil piruvato descarboxilasa (PPDC), que está codificada por el gen ipdC (40)

Por otra parte, la regulación de los genes nif, requiere un activador específico de nif; nif A actúa como una proteína potenciadora que reconoce las secuencias. (39)

4.8. Proteínas hipotéticas

Se conocen como proteínas hipotéticas a aquellas proteínas que, a pesar de conocer su secuencia, aún no ha sido posible identificar o determinar su función. Se han realizado diferentes estudios *in silico* el cual permite observar si existe alguna clase de homología de la proteína hipotética con proteínas de las bases de datos, con la finalidad de comprar dichas proteínas y de esta manera determinar si hay una homología significativa (6), con aquellas proteínas a las que se les conoce una función.

Una gran fracción de genes que han sido secuenciados y anotados de diversos microorganismos, da una visión general de las diferentes funciones que cumplen en su metabolismo, además se pueden determinar que las proteínas hipotéticas pueden representar hasta la mitad de las regiones que componen el genoma. Potenciales de codificación de proteínas de un genoma estos genes codifican a aquellos organismos que tienen en común linajes filogenéticos, pero que no han sido funcionalmente caracterizados y no se ha experimentado la proteína a nivel químico (41). Estas proteínas no solo ofrecen la presentación de nuevas estructuras sino también de nuevas funciones, abriendo campo a nuevas estructuras con formaciones desconocidas y nuevos dominios, esto ira sugiriendo una serie de nuevas rutas y cascadas proteicas adicionales y será revelado poco a poco nuestro conocimiento hasta ser completado.

- Dominios de función desconocida (Domains of unknown function DUF):

Son familias de proteínas no caracterizadas que se encuentran en la base de datos Pfam, se ha usado ampliamente para anotar genomas secuenciados. Esta base de datos agrupa cada proteína codificada por un genoma en familias homologas. Aproximadamente tres cuartos de todas las proteínas conocidas ahora coinciden con una u otra de las 10.000 familias de proteínas en Pfam. También se puede encontrar otras bases de datos como UniProt también contiene una serie de familias de proteínas no caracterizadas llamadas UPF (42).

- ORFs huérfanos

Un hallazgo interesante que ha quedado claro es que un gran porcentaje de cada genoma recién secuenciado contiene ORF codificadores de proteínas que no se parecen a ninguna

otra secuencia en las bases de datos. Este fenómeno ya está bien establecido, y parece ser una parte intrínseca del material genómico, independiente del crecimiento en el número de nuevos genomas que se secuencian. Estas secuencias únicas específicas de especie se han denominado ORF huérfanos u ORFans. Para estudiar el fenómeno ORFan, y su dinámica a medida que se secuencian nuevos genomas, se ha construido la base de datos ORFanage, que consta de todos los ORF pronosticados en genomas microbianos completamente secuenciados, y permite la búsqueda de ORFans únicos (43).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Universo: Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

5.2. Población: Bacterias del género *Pseudomonas sp.* con capacidad de promoción de crecimiento vegetal.

5.3. Muestra: *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515 con posible actividad promotora de crecimiento vegetal en tomate.

5.4. Hipótesis

- Nula: *P. extremaustralis* CMPUJ U515 no está relacionada con la promoción de crecimiento en plantas de tomate.
- Alterna: *P. extremaustralis* CMPUJ U515 está relacionada con la promoción de crecimiento en plantas de tomate.

5.5. Variables

- Independiente: factores genéticos asociados a proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 relacionada con la promoción de crecimiento en plantas de tomate.
- Dependiente: mecanismos de promoción de crecimiento para plantas de tomate (*S. lycopersicum*) debido al efecto de inoculación de *P. extremaustralis* CMPUJU 515.

5.6. Indicadores

- Secuencias de proteínas hipotéticas, medidas de longitud de tallo, hojas, raíz, peso húmedo y peso seco.

5.7. Técnicas y procedimientos

- Inóculo bacteriano

Durante este proyecto se utilizó la cepa de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 proveniente del Banco de cepas de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá D.C.), se tuvo en cuenta las fases de crecimiento para inocular las semillas de tomate (*S. lycopersicum*) con la concentración 1×10^{10} UFC/ml. El inóculo bacteriano se preparó en 20 ml de caldo Luria Bertani (NaCl 1%, peptona 1% y extracto de levadura 0.5%) que se inoculó con una unidad formadora de colonia (UFC/ml), se incubó a una temperatura de 30°C a 200 rpm por 24 horas. Posteriormente se midió la absorbancia a 600 nm hasta alcanzar un valor de D.O. 1.0, y con esta concentración se inocularon las semillas de tomate.

- Preparación suelo y semillas

El suelo usado durante el ensayo fue separado en bolsas de 500 gr, posteriormente se esterilizaron dos veces en autoclave a 121°C, 15 libras de presión, por 20 minutos, con una diferencia de 24 horas entre cada ciclo de esterilización. Las semillas de tomate se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

- Fertilizante e inoculación de las semillas

Posterior a la desinfección se inocularon en el caldo LB con una concentración de $\sim 10^5$ hasta 10^{10} UFC/ml, DO (600 nm) de 1.0, durante una hora.

Se agregó en cada vaso 0,017 mg de fertilizante (urea) (44) y 11 mg se suelo, posteriormente mezcló hasta estar completamente homogéneo, finalmente se agregó la semilla y se cubrió con 2 gramos de suelo.

- Procesamiento plantas

Las semillas ya inoculadas se sembraron en compartimentos individuales con el suelo estéril, se regaron con agua destilada estéril (10 ml) cada tercer día durante 8 semanas. Pasadas las 8 semanas se procedió a determinar las siguientes variables: longitud de raíz, longitud del

tallo, peso húmedo de la raíz, peso húmedo del tallo, peso seco del tallo y peso seco de la raíz y área foliar con el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Se realizó el mismo procedimiento con las tres poblaciones de plantas: control negativo (sin tratar con ningún microorganismo), control con fertilizante a base de urea (control absoluto), y plantas inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 y con *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo).

- Análisis bioinformático:

Para este análisis se descargó el genoma completo de *P. extremaustralis* (SAMN05421862) de la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), este genoma cuenta con 5,958 proteínas en total, se realizó una revisión completa del mismo, en donde se encontraron 1,417 proteínas hipotéticas o de función desconocida, estas proteínas se analizaron con BLASTp del NCBI para la búsqueda de secuencias de aminoácidos con similitud que pudiesen representar posibles funciones homólogas, encontrando 592 proteínas.

Las 592 proteínas hipotéticas encontradas se compararon con genes relacionados con fijación de nitrógeno y de AIA del microorganismo *Azospirillum brasilense*, por medio de BLASTp. **(Anexo 2).**

- Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas, y pruebas de comparación de medias para determinar el tratamiento que tenía el mejor efecto.

6. RESULTADOS

- Ensayo biológico de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 como promotora de crecimiento en tomate

Se realizó el ensayo en plantas de tomate con el fin de analizar el efecto de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 en dichas plantas. Se realizó la siembra de estas semillas en vasos de 9 onzas, cada ensayo de plantas control contiene 11 gr de suelo estéril, una semilla de tomate estéril, se cubrió la semilla con dos cm de suelo aproximadamente, y posteriormente se regó cada tercer día con 10 ml de agua destilada estéril. Este mismo procedimiento se realizó con los grupos de plantas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515, *P. aeruginosa* PAO1 y al grupo de plantas a los que se agregó el fertilizante.

Después de dos semanas empezó a salir la parte aérea de la planta, se continúa regando las plantas con la misma frecuencia y cantidad de agua destilada estéril. A partir de la semana cuatro, se pudo evidenciar de manera significativa un mejor desarrollo en las hojas de las plantas inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515, ya que se observa mayor tamaño, en comparación a las demás (**Figura 3**).



Figura 4. Plantas después de 4 semanas de su siembra, se puede apreciar que las plantas inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (azul) muestran un mejor desarrollo en sus hojas. (Amarillo: Control negativo, Verde: *P. aeruginosa* PAO1, Blanco: Fertilizante). Tomada por la autora. 2019

En las semanas 6, 7 y 8 se evidenció que las plantas inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 y fertilizante tuvieron mayor crecimiento en sus hojas (**Figura 4-5-6**). Ya que se realizaba una observación diaria de cambios físicos que pudiesen ocurrir en las plantas.



Figura 5. Plantas con seis semanas. (Amarillo: Control negativo, Azul: *P. extremaustralis* CMPUJU 515, Verde: *P. aeruginosa* PAO1, Blanco: Fertilizante). Tomada por la autora. 2019.



Figura 6. Plantas con siete semanas de crecimiento (Amarillo: Control negativo, Azul: *P. extremaustralis* CMPUJU 515, Verde: *P. aeruginosa* PAO1, Blanco: Fertilizante). Tomada por la autora. 2019



Figura 7. Plantas con 8 semanas de crecimiento. (Amarillo: Control negativo, Azul: *P. extremaustralis* CMPUJU 515, Verde: *P. aeruginosa* PAO1, Blanco: Fertilizante). Tomada por la autora. 2019

Finalmente después de haber cumplido el tiempo estipulado se procedió a retirar las plantas del suelo para medir el tallo y las raíces, peso húmedo y seco, y área foliar (**Figuras 7 y 8**). Los datos fueron analizados a través del programa ANOVA, este es un programa que permite realizar un análisis de varianza en muestras independientes o relacionadas. Se pudo comprobar que existieron diferencias significativas ($p < 0.01$) a favor de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (respectivamente) para el fenotipo de peso seco de la raíz, a favor de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 y *P. aeruginosa* PAO1 (respectivamente) para el fenotipo de peso húmedo del tallo, en el caso del peso húmedo del tallo *P. extremaustralis* CMPUJU 515 y *P. aeruginosa* PAO1 generaron mejores resultados que el control sin tratar y el tratamiento con fertilizante, para el parámetro de peso seco del tallo se encontró mejor resultado para el tratamiento con *P. extremaustralis* CMPUJU 515. Para el caso de la longitud del tallo no se encontraron diferencias entre los tratamientos. Cuando se analizó la longitud de la raíz, se identificó que las dos especies de *Pseudomonas* tuvieron un efecto significativo cuando se compararon contra el control sin tratar, y el tratamiento con fertilizante. Para el

caso del área foliar fue evidente que las dos cepas de *Pseudomonas* se comportaron mejor que el tratamiento con fertilizante. Los resultados se pueden encontrar en el **Anexo 1**.



Figura 8. Raíces y tallos de plantas de tomate. Tomada por la autora. 2019.

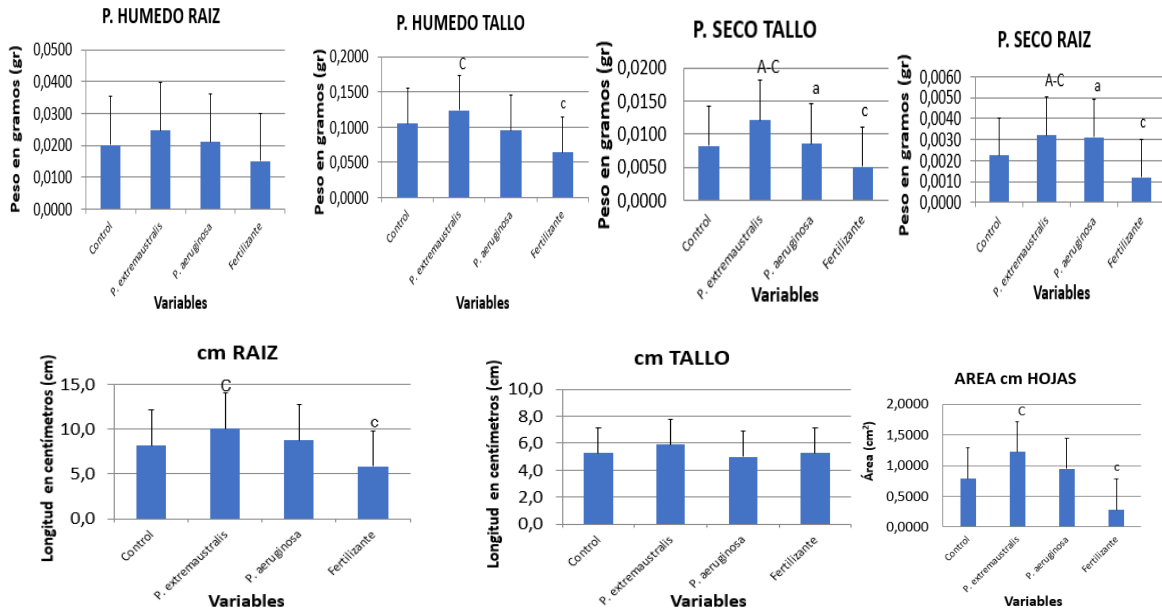


Figura 9. Evaluación de fenotipos asociados a promoción de crecimiento en tomate después del tratamiento con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y fertilizante con respecto al peso húmedo, peso seco, longitud y área foliar, de las plántulas de tomate 8 semanas después de la siembra. Barras con asterisco son significativamente diferentes ($p < 0.1$).

- **Identificación de proteínas hipotéticas relacionadas con fijación de nitrógeno y AIA en el genoma de *P. extremaustralis* CMPUJU 515**

Después de analizar el genoma completo de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 el cual posee 5,958 (100%) proteínas, se encontraron 1417 (23,7%) proteínas hipotéticas. **Figura 9.** Estas secuencias de aminoácidos se analizaron por medio del programa BLASTp del NCBI, para lograr su anotación funcional. Se evidenció que 592 (9,9%) proteínas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 pudieron ser anotadas en su función, usando parámetros de identidad mayor al 40%, cobertura de más del 80%, y valor E cercano a 0. A partir de este resultado se encontraron 116 secuencias de proteínas hipotéticas relacionadas con los genes *nifO*, *nifH*, *nifB*, *nifQ*, *nifZ*, *nifE*, *nifN*, y *nifX*. Para el caso de producción de AIA se encontraron 38 secuencias de proteínas hipotéticas relacionadas. Los resultados se pueden observar en el **Anexo 2.**

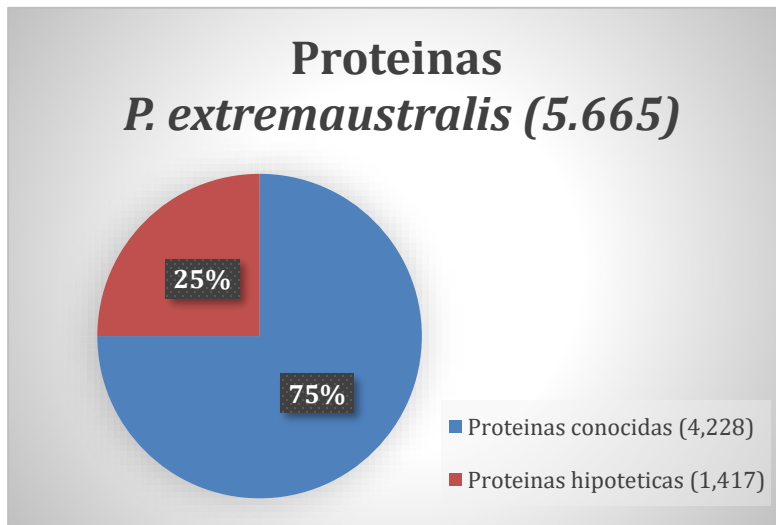


Figura 10. Representación gráfica de las proteínas encontradas en el genoma de *P. extremaustralis* CMPUJU 515.

7. DISCUSIÓN

Debido a la alta producción y demanda de alimentos que crece cada día más en el mundo, se han buscado diferentes alternativas para cumplir con esta demanda, disminuyendo el impacto que esto genera a la naturaleza. Es en este campo en donde las rizobacterias toman una gran importancia ya que se ha evidenciado que estas bacterias interactúan con la raíz de la planta modificando su desarrollo (45). Además se han realizado ensayos con abonos orgánicos en compañía de las rizobacterias, los resultados obtenidos en estos ensayos muestran que estos abonos orgánicos pueden ser una alternativa a la fertilización química que se utiliza actualmente, ya que al ser utilizados como soportes orgánicos de PGPRs, debido a que mejoran la calidad del suelo y aumentan el crecimiento de la planta, influyendo directamente en características físicas de las plantas.

Esta investigación obtuvo un aumento significativo en la longitud de la raíz, en las plantas que fueron inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (10.01 cm) (P: 0.1), frente al control, *P. aeruginosa* PAO1 y fertilizante (8.01, 8.07 y 5.08 cm) este resultado es muy significativo ya que la raíz juega un papel muy importante, al ser esta la que le aporta agua y nutrientes a la planta, además se ha demostrado que el aumento de la biomasa está directamente relacionada con su capacidad de absorción de los nutrientes encontrados en el suelo (46). Según el estudio realizado en plántulas de frijol por Ballesteros (47) se evidenció que fue mayor en los tratamientos con *P. extremaustralis* CMPUJU 515, *P. aeruginosa* PAO1 y *B. subtilis* ATCC 6633 (23.09, 23.10 y 22.39 cm) en comparación al control (20.2 cm), lo que muestra que estos microorganismos generan un efecto positivo en las raíces, propiciando su desarrollo, aumentando el peso fresco y longitud de éstas. Por su parte *P. extremaustralis* CMPUJU 515, aumentó significativamente el peso fresco de las raíces (0.0247 g) en comparación con el control, *P. aeruginosa* PAO1 y fertilizante (0.0202, 0.0211, 0.0151 g).

Según Sánchez (48) el peso seco se relaciona con la biomasa seca de la planta la cual no está solo relacionada con un aumento de la longitud sino también con el aumento del crecimiento horizontal de la misma, además se evidenció que el peso seco de la parte aérea de la planta

era mayor en aquellas plantas inoculadas con *P. putida*, se ha demostrado que la inoculación por PGPR`s liberan una serie de moléculas efectoras que están directamente relacionadas con el crecimiento en las plantas. En este estudio se evidenció que *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (0.0121 g) genera un efecto benéfico en este aspecto, ya que se apreciaron diferencias significativas con relación a las plantas tratadas con fertilizante.

El área foliar muestra una relación directa de actividad fotosintética en las plantas ya que se suele relacionar con un buen estado nutricional (48). En este estudio se obtuvo un mejor resultado en las plantas inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (1.2210 cm³) seguido por *P. aeruginosa* PAO1 (0.9457 cm³). En consecuencia de los resultados obtenidos se puede observar que *P. extremaustralis* CMPUJU 515 promueve el crecimiento de manera significativa en los diferentes parámetros analizados.

Se encontraron 592 proteínas hipotéticas las cuales fueron comparadas en la base de datos de la NCBI con proteínas de otros microorganismos, las funciones encontradas se relaciona con glicosiltransferasa, proteínas asociadas a fagos, proteína inhibidora de la nucleasa del huésped, transportador de sulfato, proteína de secreción tipo III, proteína Fe-S, lipoproteína, regulador transcripcional, proteína reparadora de DNA, transportador de azúcar, entre otros. Se ha determinado que esta predicción se puede realizar gracias a la región conservada que posee cada proteína (38), al comparar aquellas proteínas que no se les encontró una función, se procedió a comprar su secuencia de aminoácidos con genes conocidos, obteniendo una similitud con genes *nif* y genes relacionados con AIA. Esta comparación nos arrojó 116 proteínas relacionadas con genes *nif*, lo que tiene correlación con Zhimin *et al.* (29), quienes al realizar un análisis metagenómico revelaron que 742 secuencias en una comunidad microbiana de drenaje ácido de minas se identificaron como genes *nif*, incluidos los genes de subunidades estructurales *nifH*, *nifD*, *nifK*, el análisis comparativo del genoma indicó que estos genes *nif* son muy similares a los de *Herbaspirillum seropedicae*.

8. CONCLUSIONES

- El tratamiento de plántulas de tomate con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 generó aumento significativo para los fenotipos de peso seco de la raíz y el tallo en la longitud de la raíz y el área foliar, además este es el primer estudio donde se evalúa *P. extremaustralis* CMPUJU 515 como promotora de crecimiento en plantas de tomate, en Colombia.
- El estudio *in silico* de las proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 dio una visión de su posible funcionalidad en factores asociados a promoción de crecimiento en plantas, ya que se encontraron 1417 proteínas hipotéticas, de las cuales 116 están relacionadas con genes *nif* y 38 relacionadas con genes *AIA*.
- Este trabajo aporta un protocolo para contenido de nitrógeno usando espectrofotometría, que puede ser usado como un fenotipo adicional en pruebas de fijación de nitrógeno en plantas.

BIBLIOGRAFIA

1. **Vallejo Cabrera, Franco Alirio.** *Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia.* Cali : Universidad Nacional de Colombia, 1999.
2. **Carrillo Castañeda, Guillermo, y otros.** Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. 2000, Vol. 17, 3.
3. **Barraza, Fernando, Fischer, Gerhard y Cardona, Carlos.** Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle del Sinú medio, Colombia. 2004, Vol. 22, 1, págs. 81-90.
4. **Camelo, Mauricio, Vera, Sulma Paola y Bonilla, Ruth Rebeca.** Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. 2011, Vol. 12, 2, págs. 159-166.
5. **López, Nancy, y otros.** *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. 2009, Vol. 59, 5, págs. 514-519.
6. **Zarembinski, Thomas I., y otros.** Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: A test case of structural genomics. 1998, Vol. 95, págs. 15189–15193.
7. **Ribaudo, Claudia Mónica.** Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas de interés agronómico. 2013.
8. *Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimienta.* **Luna Martínez, Laura, y otros.** 2013, Revista fitotecnia mexicana, Vol. 36.
9. **ARDILA ROA, GUSTAVO HERNÁN.** Estudio del crecimiento de la planta y del fruto de tres híbridos de tomate (*solanum lycopersicum* l.) en tiempo fisiológico, bajo cubierta plástica. 2011.
10. **Rivera Cruz, María del Carmen, Rivón Hernández, Pablo y Trujillo Narcía, Antonio.** Soportes orgánicos de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y la sustentabilidad del suelo. 2011, Vol. 29, 2.
11. **Florido Bacallao, Marilyn y Bao Fundora, Lourdes.** Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). 2014, Vol. 35, 3.
12. **Castro Barquero, Leida, y otros.** Inoculación al suelo con *pseudomonas fluorescens*, *azospirillum oryzae*, *bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (mm) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. 2015, Vol. 39, 3.
13. **Juárez Maldonado, Antonio, y otros.** Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en invernadero. 2015, Vol. 6, 5.
14. **García Ríos, Alejandro, y otros.** Residuos de plaguicidas en tomate (*Solanum lycopersicum*) comercializado en Armenia, Colombia. 2017, Vol. 24, 2.
15. **Benjumeda Muñoz, Daniel.** Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. 2017.

16. **Kaliannan, Durairaj, y otros.** Characterization and assessment of two biocontrol bacteria against *Pseudomonas syringae* wilt in *Solanum lycopersicum* and its genetic responses. 2018, Vol. 206, págs. 43-49.
17. **Yadav Patade, Vikas, y otros.** Containment evaluation, cold tolerance and toxicity analysis in Osmotin transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Pusa Ruby). 2018.
18. **Vásquez Ponce, Felipe, y otros.** Phylogenetic MLSA and phenotypic analysis identification of three probable novel *Pseudomonas* species isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica. 2018, Vol. 49, págs. 695–702.
19. **Ashrafi Dehkordi, Elham, y otros.** Meta-analysis of transcriptomic responses to biotic and abiotic stress in tomato. 2018.
20. **Catone, Mariela Verónica.** Identificación y análisis de los genes asociados al metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas extremaustralis*. Buenos Aires : s.n., 2013.
21. **Lozano, Fundacion universitaria Jorge Tadeo.** Manual de produccion de tomate bajo invernadero. 2009.
22. **CCB, Cámara de Comercio de Bogotá.** Manual Tomate. 2015.
23. **Agricultura, Ministerio de.** *Evaluaciones agropecuarias municipales. Tomate.* 2016.
24. **Goldstein, Alan, Lester, Trevor y Brown, Jacquelyn.** Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprote. 2003, Vol. 1647, págs. 266-271.
25. *Aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como controlador biológico de Sclerotium rolfsii en tomate.* **B, REGEIRO D., y otros.** 89, 2017, Horticultura Argentina , Vol. 36.
26. *Efecto de Bacillus sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate (Solanum lycopersicum L).* **Cabra Cendales, Teresa, y otros.** 1, 2017, Acta Biológica Colombiana, Vol. 22.
27. **Vidal, Valentín, y otros.** Promoción del crecimiento de plantas de tomate inoculadas con *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Burkholderia tropica*. 2017.
28. **H, Urzúa.** Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. 2005, Vol. 32, 2.
29. *Identification of Nitrogen-Fixing Genes and Gene Clusters from Metagenomic Library of Acid Mine Drainage.* **Zhimin, Dai, y otros.** 2, 2014, Vol. 9.
30. *Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica.* **Paredes Mendoza, Marianela y Espinosa Victoria, David.** 1, 2010, Terra Latinoamericana, Vol. 28, págs. 61-70.
31. **Vega Celedón, Paulina, y otros.** Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. 2016, Vol. 37, especial, págs. 33-39.

32. **Tribelli, Paula M. y López, Nancy I.** Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. 2011, Vol. 2011.
33. **Tribelli, Paula M., y otros.** Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant antarctic bacterium. 2012, Vol. 194, 9.
34. *The Global Anaerobic Regulator Anr, Is Involved in Cell Attachment and Aggregation Influencing the First Stages of Biofilm Development in Pseudomonas extremaustralis.* **Tribelli, Paula M., Hay, Anthony G. y López, Nancy I.** 10, s.l. : PLoS One, 2013, Vol. 8.
35. *Tecnologías relacionadas con biofertilizantes.* **Superintendencia de industria y comercio; Pontificia universidad Javeriana.** s.l. : Superintendencia de industria y comercio, 2014.
36. **Raiger Iustman LJ, Tribelli PM, Ibarra JG, Catone M V., Solar Venero EC, López NI.** Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. 2015, Vol. 19, 1.
37. **Tribelli, Paula M., y otros.** Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the antarctic bacterium *pseudomonas extremaustralis*. 2015, Vol. 10, 12.
38. *Draft genome sequence of Pseudomonas extremaustralis strain USBA-GBX 515 isolated from Superparamo soil samples in Colombian Andes.* **López, Gina, y otros.** 78, 2017, Vol. 12.
39. *The ipdC, hisC1 and hisC2 genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in Azospirillum brasilense.* **Jijón Moreno, Saúl, y otros.** 2015, Springer.
40. *The hisC1 gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in Azospirillum brasilense Sp7, expressed in wheat.* **Castro Guerrero, Julio, y otros.** 2012, Plant Soil, págs. 139–150.
41. *Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature.* **Lubec, Gert, y otros.** 77, 2005, Vol. Elsevier.
42. **Bateman A, Cogill P, Finn RD.** DUFs: families in search of function. 2010, Vol. 66, págs. 1148–1152.
43. **Siew, Naomi, Azaria, Yaniv y Fischer, Daniel.** The ORFanage: an ORFan database. 2004, Vol. 32, págs. 281–283.
44. *Effect of foliar application of urea on the growth and yield of tomato.* **Mondal, Asit Baran y Mamun, Abdullah Al.** 3, Vol. 5, págs. 372–374.
45. *Aumento del rendimiento de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos.* **Carrillo Castañeda, Guillermo, y otros.** 3, 2000, Biotecnología Aplicada, Vol. 17.
46. *Ecology of plant growth promoting.* **ANTOUN, HANI y PRÉVOST, DANIELLE.** 38, s.l. : Z. A. Siddiqui, 2005, Vol. 1.

47. **Ballesteros Rojas, Yuli Marcela.** identificación de factores asociados a promoción de crecimiento vegetal en bacillus subtilis atcc 6633 y pseudomonas extremaustralis cmpuj u515 en el modelo de fríjol. 2018.

48. **Sanchez Lopez, Diana Beatriz.** efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (solanum lycopersicum var. sofía) bajo invernadero. Bogotá : s.n., 2011.

49. *Determinación de Nitrógeno por el Método Kjeldahl.* **Pan Reac AppliChem.** ITW reagents.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados programa ANOVA

- Peso húmedo raíz:

<i>Data Summary</i>						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	1.1925	1.8485	1.7419	0.4707		5.2536
Mean	0.018929	0.022006	0.023539	0.014709		0.020765
ΣX^2	0.043931	0.076595	0.066845	0.029661		0.217031
Variance	0.000344	0.000433	0.000354	0.000733		0.000428
Std.Dev.	0.01856	0.020802	0.018815	0.027082		0.020696
Std.Err.	0.002338	0.00227	0.002187	0.004788		0.001301

unweighted-means analysis					
<i>ANOVA Summary</i>					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	0.002085	3	0.000695	1.63	0.182938
Error	0.105854	249	0.000425		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	0.107939	252			

Ss/Bl = Subjects or Blocks depending on the design.
Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

This test will be performed only if $K > 2$ and the analysis of variance yields a significant F-ratio.

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

- Peso seco raíz:

Data Summary						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	0.1768	0.2803	0.3019	0.037		0.796
Mean	0.002806	0.003337	0.00408	0.001156		0.003146
ΣX^2	0.000631	0.001199	0.001856	0.000102		0.003787
Variance	0.000002	0.000003	0.000009	0.000002		0.000005
Std.Dev.	0.001476	0.001781	0.002924	0.001379		0.002256
Std.Err.	0.000186	0.000194	0.00034	0.000244		0.000142

unweighted-means analysis					
ANOVA Summary					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	0.000202	3	0.000067	15.47	<.0001
Error	0.001081	249	0.000004		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	0.001283	252			

Ss/Bl = Subjects or Blocks depending on the design.
Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

HSD[.05]=0; HSD[.01]=0
M1 vs M2 P<.01
M1 vs M3 P<.01
M1 vs M4 P<.01
M2 vs M3 P<.01
M2 vs M4 P<.01
M3 vs M4 P<.01

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

- Tallo peso húmedo:

Data Summary						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	6.2729	10.0704	7.6775	2.0952		26.116
Mean	0.09957	0.119886	0.10375	0.065475		0.103225
ΣX^2	0.76604	1.515835	1.011381	0.187218		3.480473
Variance	0.002281	0.003717	0.002943	0.001614		0.003114
Std.Dev.	0.047764	0.06097	0.05425	0.040175		0.0558
Std.Err.	0.006018	0.006652	0.006306	0.007102		0.003508

unweighted-means analysis					
ANOVA Summary					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	0.069781	3	0.02326	8.1	<.0001
Error	0.71486	249	0.002871		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	0.784641	252			

Ss/Bl = Subjects or Blocks depending on the design.
Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

HSD[.05]=0.03; HSD[.01]=0.03
M1 vs M2 nonsignificant
M1 vs M3 nonsignificant
M1 vs M4 P<.01
M2 vs M3 nonsignificant
M2 vs M4 P<.01
M3 vs M4 P<.01

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

- Tallo peso seco

Data Summary						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	0.5996	1.0079	0.7537	0.1621		2.5233
Mean	0.009517	0.011999	0.010185	0.005066		0.009974
ΣX^2	0.006722	0.023157	0.009253	0.001021		0.040154
Variance	0.000016	0.000133	0.000022	0.000006		0.000059
Std.Dev.	0.004046	0.011546	0.004648	0.00254		0.007712
Std.Err.	0.00051	0.00126	0.00054	0.000449		0.000485

standard weighted-means analysis					
ANOVA Summary					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	0.001132	3	0.000377	6.78	0.000206
Error	0.013856	249	0.000056		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	0.014988	252			

Ss/Bl = Subjects or Blocks depending on the design.
Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

HSD[.05]=0; HSD[.01]=0
M1 vs M2 P<.01
M1 vs M3 P<.01
M1 vs M4 P<.01
M2 vs M3 P<.01
M2 vs M4 P<.01
M3 vs M4 P<.01

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

- Tamaño tallo

Data Summary						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	333.2	490.1	389	171.7		1384
Mean	5.2889	5.8345	5.2568	5.3656		5.4704
ΣX^2	1973.32	3139.07	2268.56	1106.77		8487.72
Variance	3.4042	3.3683	3.0641	5.9836		3.6379
Std.Dev.	1.8451	1.8353	1.7505	2.4461		1.9073
Std.Err.	0.2325	0.2002	0.2035	0.4324		0.1199

unweighted-means analysis					
ANOVA Summary					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	16.9418	3	5.6473	1.56	0.199645
Error	899.8059	249	3.6137		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	916.7477	252			

Ss/Bl = Subjects or Blocks depending on the design.
Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

This test will be performed only if $K > 2$ and the analysis of variance yields a significant F-ratio.

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

- Tamaño raíz

Data Summary						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	599.2	850.6	743.8	182.6		2376.2
Mean	9.5111	10.1262	10.0514	5.7063		9.3921
ΣX^2	6983.62	10108.24	9166.1	1490.54		27748.5
Variance	20.7187	18.0109	23.1494	14.4703		21.5516
Std.Dev.	4.5518	4.2439	4.8114	3.804		4.6424
Std.Err.	0.5735	0.463	0.5593	0.6725		0.2919

unweighted-means analysis					
ANOVA Summary					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	513.056	3	171.0187	8.66	<.0001
Error	4917.9482	249	19.7508		
Ss/BI					Graph Maker
Total	5431.0042	252			

Ss/BI = Subjects or Blocks depending on the design. Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

HSD[.05]=2.19; HSD[.01]=2.67
M1 vs M2 nonsignificant
M1 vs M3 nonsignificant
M1 vs M4 P<.01
M2 vs M3 nonsignificant
M2 vs M4 P<.01
M3 vs M4 P<.01

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

- Área foliar

<i>Data Summary</i>						
	Samples					Total
	1	2	3	4	5	
N	63	84	74	32		253
ΣX	56.53	95.713	75.148	9.056		236.447
Mean	0.897302	1.13944	1.015514	0.283		0.934573
ΣX^2	63.440318	179.336179	89.632554	5.065318		337.474369
Variance	0.205095	0.84671	0.182449	0.080725		0.462291
Std.Dev.	0.452874	0.920168	0.42714	0.284121		0.67992
Std.Err.	0.057057	0.100399	0.049654	0.050226		0.042746

unweighted-means analysis					
<i>ANOVA Summary</i>					
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	17.683371	3	5.894457	14.85	<.0001
Error	98.813986	249	0.396843		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	116.497358	252			

Ss/Bl = Subjects or Blocks depending on the design.
Applicable only to correlated-samples ANOVA.

Tukey HSD Test

HSD[.05]=0.31; HSD[.01]=0.38
M1 vs M2 nonsignificant
M1 vs M3 nonsignificant
M1 vs M4 P<.01
M2 vs M3 nonsignificant
M2 vs M4 P<.01
M3 vs M4 P<.01

M1 = mean of Sample 1
M2 = mean of Sample 2
and so forth.

HSD = the absolute [unsigned] difference between any two sample means required for significance at the designated level. HSD[.05] for the .05 level; HSD[.01] for the .01 level.

**Anexo 2. Predicción de proteínas hipotéticas relacionadas con fijación de nitrógeno y
producción de AIA**

Fijación de nitrógeno

QCO16158.1 proteína de fijación de nitrógeno NifO [*Azospirillum brasilense*]

MTEVIFYGLSGCTANAKQKLQLQAAGHTLVERDLAAEPLTAETLRPFEDRPVED
WFNRRAAAVKTGAVKPDELDEESALAALLADRDLIRRPLLQVGADRKAGFDPNTL
HAWIGLTASGESCDKHSRGVCDHGHHPKQG

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	SQF97605.1	63%	77,78%	0,061
2	PIF52108.1	80%	33,33%	0,026
3	PIF52109.1	72%	41,18%	1,2
4	OHC35619.1	41%	47,62%	0,026
5	OHC3563.1	42%	58,33%	0,041
6	OHC35705.1	97%	40,00%	0,38
7	OHC35727.1	40%	50,00%	0,77
8	PIF51806.1	62%	33,33%	0,19
9	OHC35739.1	46%	37,50%	0,11
10	OHC34090.1	51%	31,82%	0,095
11	AXQ48977.1	42%	33,33%	0,049
12	OHC30316.1	50%	39,39%	0,046
13	OHC30324.1	41%	50,00%	1
14	OHC32439.1	65%	44,44%	1,1
15	WP 081280546.1	57%	33,33%	0,24
16	CQJ65440.1	43%	31,58%	0,23
17	AMW64522.1	48%	36,36%	1,2
18	AMW64528.1	51%	37,93%	0,004
19	OHC32430.1	59%	31,82%	0,51

20	SQG009911.1	54%	35,49%	0,04
21	SQF99055.1	60%	71,43%	0,092
22	SQF97455.1	50%	36,84%	0,063
23	YP 007348926.1	40%	44,44%	1,8
24	KAK52560.1	92%	32,00%	0,99

CAA35868.1 nifH [*Azospirillum brasilense*]

MSLRQIAFYGKGGIGKSTTSQNTLAALVELDQKILIVGCDPKADSTRILHAKAQDT
VLHLAAEAGSVEDLELEDVLKIGYKGIKCVESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEENG
AYDDVDYVSYDVLGDVVCGGFAMPIRENKAQEYIVMSGEMMALYAANNIAKGI
LKYAHSGGVRLGGLICNERQTDKEIDLASALAAARLGTQLIHFVPRDNIVQHAELRR
MTVIEYAPDSQQAQEYRQLANKVHANKGKGTIPTPITMEELEEMLMDFGIMKSEE
QQLAELQAKEAACA

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC3563.1	41%	71,43%	1,9
2	OHC35694.1	40%	66,67%	1,6
3	OHC30324.1	44%	34,62%	0,13
4	OHC32439.1	41%	38,10%	0,39
5	OHC32430.1	47%	46,15%	0,078
6	RZA25795.1	47%	42,86%	1,2
7	YP 00734891.7	45%	32,00%	1,2
8	YP 007348926.1	40%	42,86%	0,96

RIW05713.1 proteína de biosíntesis de cofactor de nitrogenasa NifB [*Azospirillum brasilense*]

MANVISLDSILGVGELKAAAEAPPTAAASGCASSSCGSSDGPADMAPEVWEKVKVKN
HPCYSEEAHHYFARMHVAVAPACNIQCNYCNRKYDCSNESRPGVVSEKLTDPDQAL

RKIMAVAKEIPQLSVIGIAGPGDSLAAGGKNTFKTFEMLAKKAPDLKLCLSTNGLA
 LPDHVDTIANYNIDHVTITINMVDPEVGQHIYPWIFHDHKRWTGLDAAKILHERQM
 LGLEMLTSRGILVKVNSVMIPGINDEHLMDVNKAVKSRGAFLHNIMPLISDPAHGT
 HFGLTGQRGPTAQELKVLQDQCEGGAKLMRHRQCRADAVGLLGEDRGSEFTID
 QIEAMGEVEYDQEAARTYREHVEGERAGRHAAKAAAQADVAETVGTEVQPILIA
 VATKGGERINEHFGHAKEFQIYEVGPKGAKFVGHRRVDQYCEGGSGDEDALGGV
 LSAINDUCTAVFVAKIGGCPSQNLKDAGIEPVDRFAFEYIEESALTYFKDYAERLGQG
 AINAREGQDAVIRTGAFTARRA

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	PIF52109.1	47%	35,00%	0,36
2	SQF99569.1	41%	50,00%	0,031
3	AMW64529.1	48%	32,00%	0,28

PNQ95008.1 proteína de fijación de nitrógeno NifQ [*Azospirillum brasilense*]

MIADIADPAVFSLHPPANALDGVDPDGPALDRLLFSRIVGLAAQHPPGGVTASLGLAR
 EALAEIIRRHAAAGFAHLLPTLPDGSGEDAIEEEDLRAFLLDHRAAGMVEEEWLAAI
 VARRTLGPNHLWQDMGFANRRELNAMFRRHFPSLVALNSGDMKWKKFFYRQLC
 EREGLMLCKSPNCEVCDDFSACFSAEDGDPLSALARVARGEGA

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC35557.1	41%	66,67%	0,41
2	PIF52108.1	65%	34,15%	0,13
3	PIF52109.1	40%	38,89%	0,37
4	OHC35759.1	58%	40,00%	0,23
5	OCH35681.1	66%	34,09%	0,3
6	OHC35694.1	76%	36,36%	0,026
7	OHC35705.1	58%	34,62%	0,12

8	OHC35727.1	35%	54,55%	0,085
9	OHC30316.1	43%	46,67%	0,93
10	OHC30324.1	63%	36,35%	0,28
11	PIF52072.1	59%	54,55%	0,39
12	OHC32439.1	86%	34,62%	0,24
13	OHC32430.1	55%	39,39%	0,24
14	WP 012109958.1	62%	31,25%	0,93
15	WP 121553854.1	41%	34,78%	1,1
16	YP 007348926.1	40%	83,33%	0,74
17	AUS00314.1	59%	36,36%	0,011

RIW05745.1 proteína de fijación de nitrógeno NifZ [*Azospirillum brasilense*]

MSDAVTEAKKPGFIPPREPLYDWGLAVTAAVDLHNDGSHPN AEDGALLAPKGT
 PGIIVRIGHAEGTQIPVYLVEFPAGVVVGCLEEEITPADGRRRGVPGVMD

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC35557.1	46%	33,33%	1,5
2	WP_126870679.1	50%	33,33%	1,1
3	OHC3563.1	42%	62,50%	0,68
4	OCH35681.1	59%	47,06%	0,076
5	SQF99569.1	52%	32,00%	0,13
6	OHC35694.1	46%	50,00%	1,2
7	OHC35719.1	50%	35,29%	0,51
8	OHC35727.1	74%	66,67%	0,18
9	OHC30316.1	51%	50,00%	0,074
10	OHC30324.1	73%	46,67%	0,49
11	OHC32439.1	52%	36,84%	0,42
12	AMW64516.1	44%	41,67%	1,1

13	OHC32430.1	60%	31,58%	0,5
14	SQG009911.1	77%	33,33%	2,1
15	SQF99055.1	48%	41,67%	0,11
16	WP 047906652.1	75%	35,29%	0,29
17	YP 00734891.7	66%	33,33%	3,2
18	YP 007348926.1	61%	31,03%	0,2
19	AUS00314.1	55%	50,00%	0,6

AAK51496.1 NifE [*Azospirillum brasilense*]

MLQEKLQDVFNEPGCSTNQAKSEKERKKGCSKALKPGAAAGGCAYDGAMIALQP
IADAAHLVHGPIACLGNSWDNRGTKSSGSQLYRTGFTTDMSELDIHGGEEKLYKA
IKEIVQQYDPPAVFVYQTCVPAMIGDDIEAVCKFAAKKLGKPVIPVMAPGFVGSKN
LGNKLAGETLLDTSSARWSPEVTTPTDICIVGEYNLAGELWLVKPLLDEIGIRILSCI
SGDGRYNEMAQAHRARLTMVVCSQALVNVGRKMQERWGIPYFEGSFYGVSDMS
DTLRTMARMLVERGADKAIIDRTEGVIAREESRVWRRLEPYKPRFDGKRVLLFTG
GVKSWSMVTALEGAGLTIVGTSTKKSTKEDKERIKKMKGEEFHQWDDLKPRDIYK
MLRDSEADIMMSGGRSQFIALKAKVPWLDLNQERHTPYAGYDGIVNLCEEIDKTL
SNPIWRQVRLAAPWDMKPDAPDARPVGA

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC35557.1	41%	37,50%	0,79
2	OHC35705.1	47%	53,85%	0,48
3	OHC30316.1	46%	35,00%	1
4	WP 012701539.1	40%	63,64%	0,27
5	OHC30324.1	46%	34,78%	0,96
6	AMW64505.1	42%	33,33%	0,29
7	SSU23907.1	57%	44,44%	0,61
8	KAK52560.1	45%	30,30%	0,059

9	OHC32051.1	56%	33,33%	0,067
10	OHC33851.1	41%	40,00%	0,36
11	WP 131188577.1	43%	37,50%	0,37

AAK51497.1 NifN [*Azospirillum brasilense*]

MGTIQRFPHSAKAAATNPLKMSQPLGAALAF LGVDR CMPLFHGSQGCTAFGLVLL
VRHFREAIPLQTTAMDQVSTILGGYENLEQAVRTIHERNAPALIGVATTGVTETKG
EDMAGQYSLFRQRNPALAGLKLVFANTPDFS GGFEDGFSAAVTGIVEEVVQPSETT
VKGQINVLGCHLSPGDVEELRDIIESFGLSPIFLPDL SLSMSGRQPDDFTATSLGGV
TVEQIASMGASELTLVVGHEMRVAAA ALELKT DVRSVFFDRLTGLEASDRLVRTL
SELGRPVPAKLRRQRETLVDGMLDG HFFYSRKRIAVALEPDLLYAVTSFLADMG
AEVIAAVSPTQTAVLEKLKAATVMVGDHSDVETLARDADLIVSNSHGRQGAARIG
VPLHRMGLPMFDRLGAGLKVHVGYRGTRELLFEIGNLFLSREMDHDEHGHAHGH
PHGDGHEHGQHCGSGSCGCSAG

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	PIF52109.1	45%	38,46%	0,27
2	OHC35759.1	46%	63,64%	1,3
3	OHC35719.1	41%	42,86%	0,65
4	PIF52072.1	40%	40,00%	0,64
5	OHC32439.1	41%	32,14%	0,025
6	SSU23907.1	57%	44,44%	0,61
7	KAK52560.1	41%	32,35%	0,53
8	YP 002128495.1	45%	35,14%	0,060
9	SPY38514.1	44%	30,91%	0,099
10	OHC34905.1	62%	43,75%	0,016
11	CJM49694.1	42%	63,64%	0,91

AAK51498.1 NifX [*Azospirillum brasilense*]

MRMQRRLSVVGQAEEGRPRKGGSMKVAFCTQDMQQHVDAHFGWAKNIVVYEV
 DKAGYTMVETCQFGGSMFEDGNEDKLIPKLDALADCAIVYLSAIGASAAARVVAK
 KIHVPKVEATETITALLDRLVETINGNPPPWLRKALNAGQPQELAFDEED

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC35557.1	70%	41,18%	0,23
2	SQF99163.1	42%	58,33%	0,051
3	OCH35681.1	40%	54,55%	0,44
4	OHC35694.1	80%	47,62%	0,018
5	OHC35705.1	50%	33,33%	1,9
6	RUQ46341.1	49%	34,38%	0,049
7	OHC35719.1	34%	50,00%	0,27
8	OHC35727.1	47%	30,30%	0,46
9	OHC35744.1	42%	33,33%	0,75
10	SQF97556.1	59%	66,67%	1,1
11	OHC32439.1	75%	55,56%	0,16
12	AMW64522.1	79%	57,14%	0,22
13	SQF99055.1	56%	35,29%	0,048
14	YP 00734891.7	43%	50,00%	1
15	AUR87880.1	58%	44,44%	0,96
16	YP 008869253.1	54%	42,86%	1,2
17	WP 053937255.1	59%	46,67%	0,058
18	OHC31946.1	42%	33,33%	1,1
19	CJM49694.1	80%	31,71%	0,4
20	OHC31877.1	71%	33,33%	0,024
21	OHC33851.1	47%	33,33%	0,52
22	PIF52458.1	59%	33,33%	0,3
23	WP 131188577.1	66%	42,86%	0,47

Ácido índol acético

AKE79069.1 indole pyruvate decarboxylase [*Azospirillum brasilense*]

MKLAEALLRALKDRGAQAMFGIPGDFALPFFKVAEETQILPLHTLSHEPAVGFAAD
AAARYSSTLGVA AVTYGAGAFNMVNAVAGAYA EKSPVVVISGAPGTTEGNAGLL
LHHQGRTLDTQFQVFKEITVAQARLDDPAKAPAEIARVLGAARALSRPVYLEIPRN
MVNAEVEPVGDDPAWPVDRDALAACADEVLATMRSATSPVLMVCVEVRRYGLE
AKVAELAQRLGVPVVTTFMGRGLLADAPTPLGTYIGVAGDAEITRLVEESDGLFL
LGAILSDTNFAVSQRKIDLRKTIHAFDRAVTLGYHTYADIPLDGLVDALLERLPPSD
RTRRGKEPHAYPTGLQADGEPIAPMDIARAVNDRVRAGQEPLLIAADMGDCLFTA
MDMIDAGLMAPGY YAGMGFGVPAGIGAQC VSGGKRILTVVGDGAFQMTGWELG
NCRRLGIDPIVILFNNASWEMLRTFQPESAFNDLDDWRFAEMAAGMGGDGVRVRT
RAELKAALDKAFATRGRFQLIEAMIPRGVLSDTLARFVQGQKRLHAAPRE

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	PIF52109.1	49%	44,83%	0,049
2	OHC30324.1	45%	38,71%	0,39
3	OHC32439.1	43%	40,62%	0,095
4	SQG009911.1	51%	44,44%	0,26
5	OHC31946.1	43%	42,11%	0,33
6	CJM49694.1	50%	34,15%	0,034
7	OHC31877.1	60%	30,00%	0,044
8	OHC338443.1	48%	42,86%	2,5
9	WP 131188577.1	41%	31,11%	0,96

AEB97257.1 HisC1 [*Azospirillum brasilense*]

MELLSRPGIGQIKPYRPARPPEDGAAWVDLSLTVNPLGPGKKALTA YRHMAAQI
HRYPDWSQDRLRHAIARRYDL DAGHITCANGSDEMIHLVTQAFAGPGDEVLCHEH

GYRGFMKAIRAAGATPVIAAERDLVVDVEAMIDRANERTKLCFLANPNNPTGTYIP
SEMVLRLRAGLPSHTLLVLDSAYADYCRRDNYS DGTAIVENS DNVL MVRTFSKLH
GLAGLRVGWAYG PAGVIEAVNQTRGPFNVGIAAQA AAEAA VGDTEHEEATFAHN
SAWLPWLSHELEQLGVRVYPSVCNFILARIPTDPSLGVQAVLDHLARRGILVKPTL
DYGLADCLRITVGRE DENRALVAALGEILS

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC35759.1	54%	34,62%	0,19
2	OHC35727.1	53%	63,64%	0,031
3	OHC32439.1	40%	33,33%	1,2
4	CQJ65440.1	43%	33,33%	0,21
5	AMW64522.1	48%	50,00%	0,87
6	AXQ48582.1	41%	37,14%	0,055
7	YP 002128495.1	51%	33,33%	0,77
8	SPY38514.1	65%	31,03%	0,074
9	CJM49694.1	47%	33,33%	0,5
10	OHC32156.1	40%	41,67%	1,2
11	OHC338443.1	61%	66,67%	1,2
12	WP 131188577.1	61%	40,00%	0,13

AKE79094.1 histidinol phosphate aminotransferase 2 [*Azospirillum brasilense*]

MTQPNNGPAPRPGILDIAPYVGGEHAGHIRLASNEGALGPSRAVEAYKAAAGELH
RYPDGGS AKLRKAIAERFGLDADR VVCGAGS DELIAL LIRAYAGPGDEVLYSQHGF
LMYPIGAKSVGATPVQAPETNLTTD VDSLLAHVTPRTRLV FVANPNNPTGTYITAD
EMARLHAGLPENAILVIDAAYA EYMNHNDYSAGQELVDRFPNVVMTRTFSKIFAL
GSVRLGWAYYCPAGIADVLNRVRGPFNVSSAAQIAGVAALEDTEFLERSHSHNIEW
REWFVEQVHGLGLKTHPSVTNFVLVDFAGQTPGKDDAEAARLFLKGRGILVRQM
PAYGLPSCLRVTIGTEAEMREVVQALKDFLAA

Numero	Numero de acceso	Cobertura	Identidad	Valor E
1	OHC3563.1	40%	35,29%	0,23
2	OHC32439.1	59%	35,00%	0,014
3	AMW64505.1	44%	34,69%	0,098
4	AMW64528.1	44%	50,00%	0,18
5	OHC32430.1	48%	40,00%	0,5
6	WP 092398957.1	41%	62,50%	0,53
7	AQX48504.1	46%	33,33%	0,65
8	SQF99055.1	42%	71,43%	1,3
9	PKU27657.1	46%	36,36%	0,81
10	YP 00734891.7	46%	36,84%	0,17
11	YP 002128495.1	42%	36,36%	0,14
12	SPY38514.1	75%	34,62%	0,051
13	WP 127839327.1	50%	30,99%	0,024
14	CJM49694.1	56%	35,29%	0,74
15	OHC32182.1	53%	35,00%	0,64
16	PIF52458.1	45%	40,00%	0,27
17	OHC338443.1	56%	54,55%	0,65

Anexo 3. Cuantificación de nitrógeno en tejido foliar

Como aporte adicional al trabajo se participó en una capacitación dirigida a determinar el contenido de nitrógeno en plantas, con la perspectiva de que pueda usarse en trabajos futuros. Como fruto de este proceso se contribuye al laboratorio con un protocolo para determinación de nitrógeno por medio de espectrofotometría, que se relaciona a continuación:

El nitrógeno es vital importancia para el óptimo desarrollo de plantas, es por esto que se ha buscado un método que permita determinar la concentración de nitrógeno en las plantas, ya que esta determinación daría una visión general del estado de una planta y además de los requerimientos para su óptimo crecimiento y producción. Existen diversos métodos para realizar la extracción de nitrógeno, uno de ellos es el método Kjeldahl el cual consiste en cuatro etapas principales, la primera es la digestión que se da a una temperatura de 400°C, en este paso el nitrógeno orgánico se convierte en NH_4 , en la segunda etapa “destilación” el NH_3 es destilado y trasladado a un frasco receptor en donde se realizara la tercera etapa, la cual consiste la valoración de nitrógeno (49). Por otra parte se encontró un método de colorimetría en el que no se necesita un destilador, en este método es necesario el uso de un espectrofotómetro, se basa en la reacción de Berthelot en el que se usa derivados del fenol.

PROTOCOLO DE CUANTIFICACION DE NITROGENO EN TEJIDO FOLIAR

1. Seleccionar las hojas para realizar la prueba.
2. Secar las hojas a 40°C por 3 días, al finalizar el secado se tamiza, ya que de esta manera aseguramos que la muestra sea homogénea.
3. Pesar 0,300gr de la muestra seca y tamizada, en un tubo de 75ml.
4. Adicionar 2,5ml de la mezcla de digestión y agitar bien hasta que la muestra quede bien mezclada, preferiblemente en vortex con la sustancia de digestión.
5. Dejar esta mezcla de un día para otro, para que se realice de manera adecuada pre digestión.
6. Calentar esta mezcla a 100°C por 150 minutos, posterior a esto esperar a que se enfríe.

7. Agregar de manera cuidadosa y lentamente 4 ml de peróxido de hidrogeno 30%, agregar en porciones de 1 ml (agitar), 1 ml (agitar) y 2 ml (agitar), las agitaciones se deben realizar de forma suave.
8. Calentar esta mezcla a 330°C durante 150 minutos, al terminar debe quedar una mezcla translúcida, en caso de que quede de color amarillo se debe agregar 1ml.
9. Agregar 5ml de agua hasta completar 7,5 ml, agitar y dejar reposar durante 30 minutos.
10. Taponar y poner en agitación por 20 minutos, si aparece un anillo, debemos agitar para que se rompa el anillo.
11. Filtrar la muestra.

Preparación mezcla de digestión:

Realizar todo este procedimiento en la cámara de extracción, esta solución solo es estable por 48 horas.

1. Pesar en papel mantequilla 1,05 g de Se (selenio).
 2. En un Erlenmeyer de vidrio dispensar 300 ml de ácido sulfúrico y agregar Se pesado anteriormente.
 3. Calentar a máxima temperatura en la plancha hasta que se disuelva completamente el Se. El color negro inicial cambia a azul, posteriormente cambia a un color amarillo claro o incoloro. Esperar a que esta solución se enfríe completamente.
- Pesar 21,60 g de ácido salicílico y agregarlo a la solución, disolver con agitación magnética, durante este proceso cambia de color violeta hasta llegar a un amarillo claro.